

**PHYCOCYANINABBAU
DURCH
MEMBRANGEBUNDENE PROTEASEN
AUS SULFAT-MANGELKULTUREN
VON SYNECHOCOCCUS 6301**

Priscila González Cabezas

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0052

PHYCOCYANINABBAU
DURCH
MEMBRANGEBUNDENE PROTEASEN
AUS
SULFAT-MANGELKULTUREN
VON
SYNECHOCOCCUS 6301

Dissertation
zur Erlangen des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Ma. Priscila González Cabezas
aus Villameca/Spanien

Dezember 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schmidt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Mai 1989

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines über Cyanobakterien	1
1.2 Die Phycobiliproteine	2
1.3 Der Chromophor	5
1.4 Phycobilisomen	6
1.5 Biosynthese der Phycobiliproteine	7
1.6 Faktoren die den Phycobiliproteingehalt in der Zelle beeinflussen	8
1.7 Mangelwirkungen	9
1.8 Enzyme	11
2. Problemstellung	13
3. Material und Methoden	14
3.1 Organismus	14
3.2 Nährmedien	14
3.3 Anzucht und Bearbeitung von <u>Synechococcus 6301</u> -Kulturen	15
3.3.1 Anzucht	15
3.3.2 Ernte	15
3.3.3 Chlorophyllbestimmung	16
3.4 Messung von Endopeptidasen	16
3.4.1 Azocaseinspaltung	16
3.4.2 Abbau von Phycocyanin	17
3.5 Gewinnung und Anreicherung von Phycocyanin	18
3.5.1 Polyminfällung	18
3.5.2 Ammoniumsulfatfällung und Dialyse	18
3.5.3 Reinigung von Phycocyanin an DEAE-Sephacel	19
3.5.4 Isoelektrische Fokussierung	20
3.6 Proteintrennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
3.6.1 SDS-PAGE zur allgemeinen Trennung von Phycocyanin- und Enzymtest-Proben	23

3.6.2	SDS-PAGE zur Trennung und Visualisierung von Peptiden in einem MG-Bereich von 2.500-17.000 Da.	26
3.6.3	SDS-PAGE zur Trennung von Enzymtest-Proben für die Sequenzierung der Schnittstelle am Phycocyanin	28
3.7	Geräte	31
3.8	Chemikalien	32
4.	Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	33
4.1	Modifikation des Originalmediums zur Herstellung einer S-Mangel-Kultur mit bester Phycocyanin-abbauender Aktivität	33
4.1.1	Entwicklung einer normalen Synechococcus 6301 Kultur, sowie Vergleiche unter Schwefelmangel und nach Sulfatzugabe	33
4.1.2	Wachstum von Synechococcus 6301 auf verschiedenen Schwefelquellen	34
4.1.3	Proteolytische Aktivität in verschiedenen Kulturen von Synechococcus 6301	36
4.1.3.1	Azocaseinspaltung	37
4.1.3.2	Ergebnisse zur Azocaseinspaltung	38
4.1.3.3	Phycocyaninabbau	40
4.1.3.4	Ergebnisse zum Phycocyaninabbau	41
4.1.3.5	Vergleich der durch Phycocyaninabbau bzw. Azocaseinspaltung erhaltenen Mittelwerte	43
4.1.4	L-Thiazolidin-4-Carbonsäure als Schwefelquelle	44
4.1.5	Eigenschaften der membrangebundenen enzymatischen Aktivität	46
4.1.5.1	Veränderung der enzymatischen Aktivität mit dem Alter der Kultur	46
4.1.5.2	Stabilität der enzymatischen Aktivität in der Pelletsuspension	47
4.1.5.3	Hitzestabilität der enzymatischen Aktivität des Pellet	48
4.1.5.4	Einfluß des pH-Wertes im Enzym-Test auf die proteolytische Aktivität der Pelletsuspension gegenüber Phycocyanin	49
4.1.5.5	Einfluß von Ionen im Enzymtest auf die phycocyaninabbauende Aktivität des Pellets	50
4.2	Allgemeines zur Extraktion der membrangebundenen phycocyaninabbauenden Aktivität	51
4.2.1	Extraktion der pelletgebundenen Protease(n)	51
4.2.2	Anreicherung des Rohenzyms durch Trennung an DEAE-Cellulose	54

4.2.3	Eigenschaften des angereicherten Enzymextraktes	56
4.2.3.1	Kinetik des Abbaues von Phycocyanin durch den angereicherten Enzymextrakt	56
4.2.3.2	Stabilität des angereicherten Enzymextraktes	58
4.2.3.3	Hitzestabilität des angereicherten Enzymextraktes	58
4.2.3.4	Einfluß des pH-Wertes im Enzym-Test auf die proteolytische Aktivität des Enzymextraktes gegenüber Phycocyanin	59
4.2.3.5	Einfluß von Ionen in Enzym-Test auf die phycocyaninabbauende Aktivität des angereicherten Enzymextraktes	59
4.2.3.6	Aktivität des angereicherten Enzymextraktes gegenüber Phycobiliproteinen anderer Organismen	60
4.2.3.7	SDS-PAGE von angereichertem Enzymextrakt sowie von intaktem Phycocyanin und Phycocyanin nach proteolytischem Abbau	61
4.3	Veränderung von Phycocyanin durch den Enzymextrakt und Suche nach den PC-Bruchstücken	66
4.3.1	SDS-PAGE von Enzymtest-Proben in einem Molekulargewicht-Bereich von 14.200 - 66.000 Dalton	66
4.3.2	Suche nach kleineren Phycocyaninabbauprodukten durch Veränderung der Elektrophorese-Bedingungen	70
4.3.3	Untersuchungen zur Bestimmung von Chromopeptiden nach dem Abbau von Phycocyanin durch den Enzymextrakt	75
4.3.4	Identifizierung der Schnittstelle des Peptides mit dem Molekulargewicht von 8.300 Dalton	78
5.	Diskussion der Ergebnisse	81
5.1	Phycocyaninabbauende Aktivität in Kulturen von <i>Synechococcus</i> 6301 unter normalen Bedingungen und Schwefelmangel	84
5.2	Extraktion und Anreicherung der membrangebundenen, phycocyaninabbauenden Protease(n)	89
5.3	Eigenschaften des phycocyaninabbauenden Enzyms	94
5.4	Veränderungen am Phycocyanin durch den Abbau mit dem aus Schwefelmangel-Kulturen gewonnenen Enzymextrakt	97
5.5	Schnittstelle des Enzyms an Phycocyanin	99
6.	Zusammenfassung	103
7.	Literaturverzeichnis	106

Abkürzungen

APC	= Allophycocyanin
ATP	= Adenosin-5'-Triphosphat
Da.	= Dalton
L-T-4-C	= L-Thiazolidin-4-Carbonsäure
M	= Molar
MG	= Molekulargewicht
NaSCN	= Natriumthiocyanat
NG	= Naßgewicht
O.D.	= Optische Dichte
PBP	= Phycobiliproteine
PC	= Phycocyanin
PE	= Phycoerythrin
SDS-PAGE	= Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SGF	= Silikonisierte Glasfaser
TEMED	= N,N,N',N'-Tetramethylaethylendiamin
Tris	= Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Um/min	= Umdrehungen pro Minute
(v/v)	= Volumenprozent
(w/v)	= Gewichtsprozent

1. Einleitung

1.1 Allgemeines über Cyanobakterien

Die Blaualgen, Myxophyceae (COLLOCOTT, 1979) oder auch nach der jetzigen Nomenklatur (STANIER and COHEN-BAZIRE, 1977; WHITTON and CARR, 1982) Cyanobakterien genannt sind einzellige oder filamentförmige photoautotrophe Prokaryonten, die in der Lage sind, dem Wasser Elektronen für die CO₂ Reduktion zu entnehmen (STANIER et al., 1971). Sie sind seit über 3 Milliarden Jahren auf der Erde und sind stark verbreitet, so daß sie als Haupt-O₂-Produzenten unserer oxidativen Atmosphäre zu nennen sind (HASELKORN, 1978).

Ihre photosynthetischen Eigenschaften sind identisch mit denen der Chloroplasten der höheren Pflanzen und sie besitzen wie diese Photopigmente wie Chlorophyll a und β -Carotine, jedoch kein Chlorophyll b (STANIER et al., 1971; GLAZER, 1983). Sie zeichnen sich aber dadurch aus, daß sie durch die Bildung von besonderen farbigen Proteinen, den Phycobiliproteinen, ein erweitertes Lichtspektrum für die Photosynthese nutzen können; nämlich den Spektralbereich von grün bis orange, welcher von den Antennenpigmenten grüner Pflanzen nur wenig genutzt werden kann, aber mehr als 50 % der Lichtaufnahmekapazität bei Cyanobakterien (GLAZER, 1983) ausmacht. Das ist ein ökologischer Vorteil in tieferen Gewässern sowie unter einem Schirm grüner Pflanzen (DUYSENS et al., 1961; MYERS, 1971; GLAZER and BRYANT, 1975; GLAZER and HIXSON, 1977).

Phycobiliproteine kommen, außer bei Cyanobakterien, auch bei Rhodophyten (GLAZER and HIXSON, 1977) und Kryptophyten (ALLEN, 1960) als Lichtsammlerpigmente vor, und bilden mit Phytochrom aus höheren Pflanzen (GROMBEIN et al. 1975; KLEIN et al. 1977; RÜDIGER, 1980) und Phycocyanin aus Cyanobakterien (SCHEIBE, 1972; BJÖRN and BJÖRN, 1976; BJÖRN, 1978) die Gruppe der Biliproteine. Phytochrom und Phycocyanin sind aber keine Lichtsammlerpigmente, sie dienen

eher der Lichtperzeption. Biliproteine sind Proteinkomplexe von Gallenfarbstoffen mit kovalenter Protein-Chromophorbindung. Das einzellige Cyanobakterium Synechococcus 6301 (ehemals Anacystis nidulans) ist für Untersuchungen zum Stoffwechsel, sowie der Photosynthese prokaryotischer Organismen gut geeignet, da es sich einfach unter sterilen Bedingungen ziehen läßt und sehr gut und schnell wächst, mit Verdopplungszeiten von etwa 4 bis 5 Stunden. Es liegen zudem über diesen Organismus viele vergleichende physiologische und biochemische Untersuchungen vor (PAPAGEORGIOU and PACKER, 1983). Anacystis nidulans wurde schon frühzeitig von ALLEN (1952) isoliert und war jahrelang das einzige Exemplar der Chroococcales, welches als Sterilkultur erhältlich war (STANIER et al., 1971).

1.2 Die Phycobiliproteine

Phycobiliproteine sind in der Algenzelle sehr stark vertreten, so daß ihre Konzentration mehr als 60 % des löslichen Proteins, oder bis 20 % des Trockengewichts betragen kann (ELEY, 1971; BOGORAD, 1975).

Hauptsächlich gibt es drei unterschiedliche Phycobiliproteine: die roten Phycoerythrine, die blauen Phycocyanine und die Allophycocyanine. Die Menge der einzelnen Pigmente variiert in der Zelle und bedingt die charakteristische Färbung der sie tragenden Organismen. Ein anderes Phycobiliprotein, Phycoerythrocyanin, wurde auch in wenigen Cyanobakterien gefunden (BRYANT et al., 1976; FUGLISTALLER et al., 1983). Alle Blau- und Rotalgen enthalten Phycocyanin und Allophycocyanin, z.B. die Blaualge Synechococcus 6301 (MANADORI et al., 1984), während andere Algen zusätzlich Phycoerythrin enthalten, z.B. Porphyridium cruentum (GANTT and LIPSCHULTZ, 1972).

Nach ihrem Vorkommen sowie nach ihrem spektralen Verhalten, werden die Phycoerythrine in B-, C-, R-, und Cryptomonad-Phycoerythrin und die Phycocyanine in C-, R-, Allo-, und Cryptomonad-Phycocyanin unterteilt (BOGORAD, 1975).

Das Verhältnis der verschiedenen Phycobiliproteine zueinander bzw. zu Chlorophyll ist häufig komplementär abhängig von der Far-

be des Lichtes, in der die Algen wachsen. In rotem Licht bildet Fremyella diplosiphon mehr Phycocyanin und kein Phycoerythrin, während in grünem Licht ein gegensätzlicher Effekt beobachtet wurde (BENNET and BOGORAD, 1973; BOGORAD, 1975).

Die spektroskopischen Eigenschaften der Phycobiliproteine sind sowohl vom Typ als auch vom Aggregationszustand (JOHN, 1986) abhängig. So liegt die Absorption der Phycoerythrine zwischen 498 und 568 nm, die Emission bei 578 nm; die der Phycocyanine: Absorption 620 nm, Emission 660 nm und für Allophycocyanin: Absorption 650 nm, Emission 680 nm (LARKUM, 1977; GANTT, 1981; KÖST et al., 1981; PRIESTLE et al., 1982). Auch die einzelnen Chromophore eines Phycobiliproteins haben spezifische spektroskopische Eigenschaften (SIEBZEHRÜBL et al., 1987).

Phycobiliproteine bestehen meistens aus zwei nicht kovalent gebundenen Untereinheiten, den Polypeptiden α und β , die normalerweise im Verhältnis 1:1 vorhanden sind (BENNET and BOGORAD, 1971; BROWN et al., 1979; BISHOP et al., 1986). Eine zusätzliche γ -Untereinheit wurde für Allophycocyanin I (ZILINSKAS et al., 1978; TROXLER et al., 1980) sowie für R- und B-Phycoerythrin (MÖRSCHER et al., 1980; KLOTZ and GLAZER, 1985; NAGY et al., 1985) beschrieben.

Das Molekulargewicht der Untereinheiten kann bei verschiedenen Organismen unterschiedlich sein, aber auch von den Arbeitsbedingungen im Labor abhängen. Das Molekulargewicht wird durch SDS PAGE (Polyacrylamid gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfat) (WEBER et al., 1972; TANDEAU de MARSAC and COHEN-BAZIRE, 1977; CABRAL and SCHATZ, 1979) bzw. durch Berechnung nach Aminosäure- und Chromophorgehalt ermittelt (BOGORAD, 1975). Normalerweise ist die α -Kette mit 12000 bis 20000 Dalton etwas kleiner als die β -Kette mit 15000 bis 22000 Dalton. Bei Allophycocyanin wurde sowohl über eine einzige Kette mit 16000 Dalton bei Fremyella diplosiphon (BENNET and BOGORAD, 1971) oder 14500 Dalton bei Porphyridium cruentum (GANTT and LIPSCHULTZ, 1974), als auch über zwei Ketten mit α = 15500 und β = 17500 Dalton bei Synechococcus sp. und Aphanocapsa sp. (GLAZER and COHEN-BAZIRE, 1971) berichtet.

Die Phycobiliproteine von Synechococcus 6301 haben nur α - und β -Ketten im Verhältnis 1:1. Phycocyanin α = 15900 Dalton; β =

19100 Dalton. Allophycocyanin α = 15200 Dalton; β = 17200 Dalton. (GLAZER and COHEN-BAZIRE, 1971).

Die Phycobiliproteine kommen als Oligomere vor. So ist der ($\alpha\beta$)-Oligomer (in Ausnahmefällen auch Di- und Monomere; ZICKENDRAHT et al., 1980; JOHN, 1986) die kleinste stabile Form der Phycobiliproteine. Zwei Trimere können zu einem Hexamer aggregieren und dieses Hexamer ist der Grundstein der Phycobilisomen (BRYANT et al., 1976; MÖRSCHER et al., 1980).

Die Aminosäure-Sequenz der α - und β -Untereinheiten, sowie die genaue Bindestelle zwischen Chromophor und Apoprotein sind schon für Phycobiliproteine aus mehreren Organismen veröffentlicht worden (FRANK et al., 1978; FREIDENREICH et al., 1978; TROXLER and BROWN, 1979; WALSH et al., 1980; DeLANGE et al., 1981; FUGLISTALLER et al., 1983).

Die komplette Aminosäure-Sequenz von C-Phycocyanin aus Synechococcus 6301 wurde für die α -Kette von WALSH et al. (1980), für die β -Kette von FREIDENREICH et al. (1978) beschrieben.

Obwohl bei verschiedenen Organismen die Aminosäure-Sequenzen in sich unterschiedlich sind, lassen sich in diesem Bereich die Evolutionswege zurückverfolgen. So ist, bezüglich der Aminosäure-Sequenz, die Übereinstimmung zwischen den α - und β -Ketten eines Phycobiliproteins groß (30 %), zumindest für die ersten 75 % der Kettenlänge, während sie für den Rest gleich null ist (FRANK et al., 1978; WILLIAMS and GLAZER, 1978). Noch ähnlicher sind sich die Ketten in der Nähe der Chromophor-Bindestelle (BYFIELD and ZUBER, 1972; BRYANT et al., 1978; MUCKLE et al., 1978; DeLANGE et al., 1981). Besonders große Homologie wurde zwischen den entsprechenden α - und β -Ketten der unterschiedlichen Phycobiliproteine von Mastigocladus laminosus (FUGLISTALLER, 1983) gefunden, sowie zwischen den α -Ketten aus Phycocyanin der eukaryonten Rhodophyte Cyanidium caldarium und einer Zyanophyte prokaryonte (85 %) (TROXLER and BROWN, 1979).

TROXLER und BROWN (1979) interpretieren die große Übereinstimmung zwischen Phycocyanin von Prokaryonten und Eukaryonten als notwendig für die Verknüpfung der Phycobilisomen und als ein Produkt der Evolution aus einem ancestralen Gen. Zwischen nativem Phycocyanin und hybridem Phycocyanin aus α - und β -Ketten verschiedener Organismen wurden keine Unterschiede bezüglich chromato-

graphischer Eigenschaften, Absorptions-Spektrum und Verhalten in der isoelektrischen Focussierung gefunden (GLAZER and FANG, 1973b). Bezüglich der Tertiärstruktur von Phycocyaninen verschiedener Organismen und mit ganz anderer Aminosäure-Sequenz und Zusammensetzung, lassen sich kaum Unterschiede feststellen (LESK and CHOTHIA, 1980; SCHIRMER et al., 1987).

1.3 Der Chromophor

Allgemein trägt die α -Kette einen, die β -Kette zwei Chromophore (GLAZER and FANG, 1973a; WILLIAMS and GLAZER, 1978), aber bis zu vier Chromophore an einer Untereinheit (die β -Kette) sind schon gefunden worden (GANTT, 1981; KLOTZ and GLAZER, 1985). Allophycocyanin trägt nur einen Chromophor pro Untereinheit (GLAZER and FANG, 1973a; DeLANGE et al., 1981).

Chromophore sind offenkettige Tetrapyrrole, welche kovalent durch eine Thioetherbindung zwischen Ring A (C^3) und Cystein (jeweils an den Positionen ca. 80 der α -Kette und ca. 80 und 130-150 der β -Kette) am Apoprotein gebunden sind (KÖST, 1974; KÖST-REYES et al., 1975; BEULER et al., 1976; KÖST, 1978; MUCKLE et al., 1978; BROWN et al., 1979; KÖST-REYES and KÖST, 1979; SCHROPP, 1986). Es gibt auch Hinweise auf eine zweite Esterbindung zwischen Ring C und Serin (SCHNEIDER and BOGORAD, 1979; O'CARRA et al., 1980; SCHEER, 1981), sowie auf eine zusätzliche (KLOTZ and GLAZER, 1985; NAGY et al., 1985) bzw. alternative (BISHOP et al., 1986) Thioetherbilinbindung am Ring D (C^1) (GLAZER et al., 1979a).

Die zwei hauptsächlichen Chromophore der Phycobiliproteine sind Phycocyanobilin, der blaue Chromophor der Phycocyanine und Allophycocyanine (RÜDIGER et al., 1967; SCHRAM and KROES, 1971; BEULER et al., 1976) und Phycoerythrobilin, der rote Chromophor der Phycoerythrine (RÜDIGER et al., 1967; CRESPI and KATZ, 1969). Daneben gibt es andere Chromophore mit ungeklärter Struktur, wie z.B. Phycourobilin (GLAZER and HIXSON, 1977; O'CARRA et al., 1980) und den Chromophor P590 (GLAZER and COHEN-BAZIRE, 1975).

1.4 Phycobilisomen

Die Phycobiliproteine sind in vivo zu makromolekularen Strukturen aggregiert, den Phycobilisomen. Diese sind die eigentlichen Lichtsammler in Cyanobakterien und Rotalgen. Sie bilden - an der Außenseite der Thylakoidmembran regelmäßig verteilt - eine bidimensionale, kristalline Struktur (GANTT and CONTI, 1966; GANTT and LIPSCHULTZ, 1972; YAMANAKA et al., 1978; BRYANT et al., 1979; GLAZER et al., 1979 b; WANNER and KÖST, 1980). Je nach Spezies haben die Phycobilisomen unterschiedliche Größe und Feinstruktur (GLAZER et al., 1979 b). Bisher sind die aus Porphyridium cruentum, mit einer Halb-Ellipsoid-Rotations-Form und einer Größe von ca.: $2a = 40$; $2b = 19$; $c = 28$ (GANTT, 1977; WANNER and KÖST, 1980; GANTT, 1981) und die aus Synechococcus 6301, mit einer Hemidiskoidal-Form (YAMANAKA et al., 1978; YAMANAKA and GLAZER, 1980; LUNDEL et al., 1981 a; YAMANAKA and GLAZER, 1981) am besten untersucht. Eine komplette, detaillierte strukturelle Information liegt allerdings nur für Synechococcus 6301 vor (GLAZER, 1983).

Die Phycobilisomen bestehen ausschließlich aus Proteinen: Phycobiliproteinen (Phycocyanin, Allophycocyanin und bei manchen Algen auch Phycoerythrin) und 10 bis 20 anderen größeren Polypeptiden, die zum Aufbau des Phycobilisoms dienen (TANDEAU de MARSAC and COHEN-BAZIERE, 1977; YAMANAKA and GLAZER, 1981; GLICK and ZILINSKAS, 1982; YU and GLAZER 1982; LUNDELL et al., 1981 a; LUNDELL et al. 1981 b; GLAZER, 1983). Die Phycobilisomen bestehen aus einem Allophycocyanin-Kern, auf den zuerst die Phycocyanine und auf diese die Phycoerythrine (wenn vorhanden) aufgebaut sind. Synechococcus 6301 hat einfache Phycobilisomen mit nur Phycocyanin (75 %), Allophycocyanin (12 %) und farblosen Polypeptiden (12 %) (YAMANAKA et al., 1978). Der Kern besteht aus zwei Paketen von je vier Allophycocyanin-Trimer-Komplexen. Jedes Allophycocyanin-Paket ist an ein 75 K-Dalton Polypeptid gekoppelt, welches der Terminal-Energie-Akzeptor sein mag (LUNDELL et al., 1981 b). Auf diesem Allophycocyaninkern sind sechs Phycocyanin-Pakete aufgebaut, welche je aus drei Hexameren bestehen. Jedes Hexamer trägt ein Peptid (27; 33 oder 30 K-

Dalton) mit sich, das für den Aufbau der Phycobilisomen eine Rolle spielen soll (YAMANAKA and GLAZER, 1980; LUNDELL et al., 1981 a; YAMANAKA et al., 1981; YU et al., 1982; GLAZER, 1983). Die Organisation der Phycobilisomen ist auf beste Energieübertragung ausgelegt, so daß Quantenausbeuten bis 100 % erreicht werden (GRABOWSKI and GANTT, 1978 a+b; SCHEER, 1981). Die Energieübertragung findet in der folgenden Form statt:

Phycoerythrin (bzw. Phycoerythrocyanin) -> Phycocyanin -> Allophycocyanin F660 -> Allophycocyanin F675-680 -> Photosystem II Chlorophyll (GANTT, 1981).

Die von den Phycobilisomen aufgenommene Energie scheint hauptsächlich an das Photosystem II übertragen zu werden, welches sich in den Thylakoidmembranen befindet (BRICKER and SHERMAN, 1984). Jedoch liegen für Synechococcus 6301 unterschiedliche Ergebnisse vor. So beschrieben WANG et al. (1977) die Aufteilung der Energieübertragung unter physiologischen Bedingungen auf 60 % Photosystem II und 40 % Photosystem I, während neuere Arbeiten von MANODORI et al. (1984) den Beweis einer strikten strukturellen Assoziation der Phycobilisomen mit dem Photosystem II erbrachten.

1.5 Biosynthese der Phycobiliproteine

Die Kenntnisse über die Biosynthese der Phycobiliproteine sind noch sehr lückenhaft. Nach EGELHOFF und GROSSMAN (1983) werden bei Eukaryonten die farbigen Pigmente (α - und β -Ketten der Biliproteine) sowie die größeren Polypeptide (MG ca. 90 K-Dalton) auf dem Plastidengenom codiert und an den 70 S-Ribosomen translatiert, während die restlichen farblosen Polypeptide der Phycobilisomen im Cytosol translatiert und durch die Kern-DNA codiert werden.

Der Startpunkt der Biosynthese des Phycobilin-Chromophors ist die δ -Aminolaevulinsäure (KÖST and BENEDIKT, 1982) direkt via Haem (BROWN et al., 1981) und nicht via Magnesium-Protoporphyrin IX, wie TROXLER (1972) postuliert hatte (Übersicht BOGORAD, 1975). Da STEINMÜLLER et al. (1983) die "in vitro"-Synthese vom far-

blösen Apoprotein gelang und SCHUSTER et al. (1983) bei Cyanidium caldarium durch Hemmung der Porphyrinsynthese farbloses Apoprotein anreichern konnten, das bei Zusatz von Haem prozessiert wurde, ist damit geklärt, daß das Apoprotein zuerst synthetisiert wird und dann der Chromophor angeknüpft wird.

1.6 Faktoren die den Phycobiliproteingehalt in der Zelle beeinflussen.

Die zu den Phycobilisomen aggregierten Phycobiliproteine sind die Hauptlichtenergiesammlerpigmente der Cyanobakterien. Andererseits betragen sie 60 % des gesamten Proteins der Zelle, deren Synthese auch sehr viel Energie kostet. So muß es für die Zelle von Vorteil sein, die Rate des Phycobiliproteingehalts zu kontrollieren und an die Umweltbedingungen anpassen zu können (LAU et al., 1977).

Ein erster bedingender Faktor ist sicherlich das Licht. Prinzipiell stimuliert Licht die Phycobiliprotein-Biosynthese bei allen Organismen. Es wurde zwar über Phycobiliprotein-Biosynthese im Dunkel berichtet (OHKI and FUGITA, 1978), jedoch sind die Mengen gering im Vergleich mit denen, die in Licht erreicht werden. Aber nicht nur Quantität sondern auch Qualität des Lichtes beeinflussen die Phycobiliprotein-Biosynthese bzw. ihren Abbau, so wurde bei Cyanobakterien, wie Fremyella diplosiphon und Tolythrix tenuis, über Chromatische Adaptation berichtet (BENNET and BOGORAD, 1973; BOGORAD, 1975).

Bezüglich ihrer Lichtanpassungsfähigkeit sind die Cyanobakterien von TANDEAU de MARSAC (1977) in drei Gruppen aufgeteilt worden. Zu Gruppe I gehören Spezies, wo die Zusammensetzung der Phycobiliproteine nicht von der Farbe des Lichtes abhängig ist. Bei Spezies der Gruppe II wird Phycoerythrin nur in grünem Licht gebildet, aber nicht in rotem Licht. Die Biosynthese von Phycocyanin bleibt dabei unverändert. In Organismen der Gruppe III wird sowohl Phycocyanin als auch Phycoerythrin photoreguliert. Im grünen Licht wird Phycoerythrin und Phycocyanin produziert. Im roten Licht wird die Biosynthese von Phycoerythrin gehemmt und

ein Extra-Set von Phycocyanin-Genen zusätzlich aktiviert (BRYANT and COHEN-BAZIRE, 1981), so daß mehr Phycocyanin entsteht. An der Größe der Phycobilisomen lassen sich diese Unterschiede auch feststellen (BRYANT et al., 1979; WILLIAMS et al., 1980; ROSINSKI et al., 1981). Synechococcus 6301, das kein Phycoerythrin besitzt, paßt sich niedriger Lichtintensität an, indem mehr Phycocyanin produziert wird, so daß die Phycobilisomen längere Stäbchen haben. Der Allophycocyanin-Kern bleibt dabei immer unverändert (YAMANAKA and GLAZER, 1981).

Photorezeptoren, welche die Phycobiliprotein-Biosynthese regulieren sollen, werden von BOGORAD (1975) "Adaptochrome" genannt. Tatsächlich wurden photoreversible Pigmente, die Phycochrome, aus Phycobiliprotein-Fraktionen isoliert, welche die Aufgabe der Adaptochrome erfüllen könnten (SCHEIBE, 1972; BJÖRN and BJÖRN, 1976; BJÖRN, 1978).

Nicht nur das Licht beeinflusst den Phycobiliproteingehalt bei Cyanobakterien, auch die Verfügbarkeit vieler für den Organismus lebensnotwendiger Substanzen wie: CO₂ (ELEY, 1971; MILLER and HOLT, 1977), Phosphat (IHLENFELDT and GIBSON, 1975), Eisen (SHERMAN and SHERMAN, 1983), Stickstoff (ALLEN and SMITH, 1969; LAU et al., 1977; ALLEN and HUTCHISON, 1980; STEVENS et al., 1981) und Schwefel (SCHMIDT, 1981; SCHMIDT et al., 1982; KÖST et al., 1983; WANNER et al., 1986); extreme Temperatur-Bedingungen (2-15 °C und 48-50 °C), wie auch metabolische Inhibitoren und Antibiotika (SCHREIBER et al., 1979; SCHMETTERER and PESCHEK, 1981) spielen dabei eine Rolle.

1.7 Mangelwirkungen

Der erste unter Mangelbedingungen allgemein beobachtete Effekt ist ein Verlust an Phycobiliproteinen, welcher bei den Cyanobakterien die typische Blaugrünfärbung in gelbgrün umschlagen läßt. Somit könnten Phycobiliproteine neben der Lichtassimilation eine zweite Funktion, eine Reserve an Proteinmaterial, in der Zelle haben, so daß diese unter Mangelbedingungen als erstes abgebaut werden (BOUSSIBA and RICHMOND, 1980). Genauere Untersuchungen

lassen unter Mangelbedingungen große strukturelle und biochemische Veränderungen erkennen (PEAT and WHITTON, 1967; NIERZWICKI et al., 1982; NIERZWICKI-BAUER et al., 1984). Die meisten Ergebnisse, die vorliegen, beziehen sich auf Stickstoffmangel bei Cyanobakterien sowie bei grünen (CZYKAN, 1968; MAYER and CZYKAN, 1969) und roten Algen (WEHRMAYER and SCHNEIDER, 1975; KÖST et al., 1984; WANNER and KÖST, 1984).

OWNBY et al. (1979) beobachteten bei Stickstoffmangelkulturen von Anabaena 7120 während der ersten 6 Stunden eine drastische Abnahme (50 bis 70 %) des Aminosäuregehalts sowie der Proteinbiosynthese im Vergleich zu normal gewachsenen Zellen. In den Stunden danach zeigten sich keine Unterschiede bezüglich Proteinbiosynthese zwischen normalen und Stickstoffmangel-Kulturen. Während der 4. bis 12. Stunde unter Stickstoffmangel wurden die vorher synthetisierten Proteine 6 bis 7,5 mal schneller abgebaut als bei normal gewachsenen Kulturen.

Neben dem Abbau von Phycocyanin (ALLEN and SMITH, 1969; LAU et al., 1977) bewirkt der Stickstoffmangel bei Cyanobakterien den Abbau der Cyanophycin-Polypeptide (SIMON, 1973; De VASCONCELOS and FAY, 1974; ALLEN and HUTCHISON, 1980; ALLEN et al., 1980), sowie von Chlorophyll a, von freiem Stickstoff in der Zelle, von Phycobilisomen, von Ribosomen und Thylakoidmembranen (YAMANAKA and GLAZER, 1980; STEVENS et al., 1981).

Aufgebaut werden Polysaccharide und Lipide (ALLEN and SMITH, 1969; De VASCONCELOS and FAY, 1974; STEVENS et al., 1981), sowie Polyphosphate (FRIGA et al., 1981).

Manche filamentförmige Cyanobakterien wie Anabaena cylindrica (WOLK and WOJCIUCH, 1971), Nostoc muscorum (FLEMING and HASELKORN, 1973) und Anabaena variabilis (PETERSON and WOLK, 1978) besitzen die Fähigkeit, unter anaeroben Bedingungen den Stickstoff aus der Luft zu fixieren. Unter Stickstoffmangel werden in regelmäßigen Abständen Zellen differenziert, die sogenannten Heterocysten, die die o.g. Aufgabe übernehmen (HASELKORN, 1978). Bei Cyanobakterien, die Heterocysten bilden können, sind die Stickstoffmangeleffekte in diesen Zellen stärker ausgeprägt.

Viel weniger als über Stickstoffmangel ist über Schwefelmangel bekannt, sowohl für rote Algen (KÖST et al., 1984; WANNER and

KÖST, 1984) als auch für Cyanobakterien (SCHMIDT, 1981; SCHMIDT et al., 1982; KÖST et al., 1983; WANNER et al., 1986). Wie bei anderen Mangelbedingungen wurde unter Schwefelmangel bei Synechococcus 6301 ein Abbau von C-Phycocyanin beobachtet, während Chlorophyll a bis zu einem gewissen Grad unverändert bleibt (SCHMIDT et al., 1982). In weiteren Stadien werden auch Phycobilisomen und Chlorophylle abgebaut (WANNER et al., 1986). Die Menge an Cyanophycin-Polypeptiden steigt bei Aphanocapsa 6308 unter Schwefelmangel im Gegensatz zu der beobachteten Verminderung unter Stickstoffmangel (ALLEN et al., 1980). Als Speicherprodukte lagert Synechococcus 6301 unter Schwefelmangelbedingungen neben Glycogen (wie bei Stickstoffmangel) zusätzlich Poly- β -Hydroxybutter-Säure (PHB) und kugelförmige Zytoplasma-Einschlüsse (HENKELMANN, 1984; WANNER et al., 1986) ein, ähnlich den Lipid-Körpern in höheren Pflanzen (WANNER et al., 1981). Nach Wachstum von Synechococcus 6301 unter Schwefelmangelbedingungen ließ sich aus dem Medium ein gelbgefärbter Extrakt gewinnen (SCHROPP, 1986).

Alle Mangelwirkungen sind bis zu einem gewissen Grad reversibel und die Zelle hat die Fähigkeit sich zu regenerieren, wenn der entsprechende Faktor zu der Mangelkultur zugefügt wird. Als erstes wird Phycocyanin synthetisiert (LAU et al., 1977) und parallel dazu werden die Speicherprodukte abgebaut. Erst wenn der Zellzustand sich normalisiert hat, beginnt die Zellteilung. Bei Synechococcus 6301 wurde in SDS-PAGE bei der Regenerierung nach Schwefelmangel neben den α - und β -C-Phycocyanin-Untereinheiten ein zusätzliches 43300 Dalton Polypeptid gefunden (KÖST et al., 1983). Die Regenerierung nach NO_3 -Mangel und SO_4 -Mangel von Synechococcus 6301 läuft nicht parallel. So haben sich NO_3 -Mangel-Zellen nach 9 Stunden in komplettem Medium praktisch vollständig regeneriert, während Zellen nach SO_4 -Mangel in derselben Zeit noch starke Mangelmerkmale aufweisen (WANNER et al., 1986).

1.8 Enzyme

Wie es bei den großen Veränderungen, die in der Zelle unter Mangelbedingungen stattfinden, zu erwarten ist, werden unter diesen

Umständen auch die enzymatischen Aktivitäten sehr stark verändert und angepaßt. So werden z.B. die Enzyme der Nitrat-Assimilation stark vom Licht reguliert (STEVENS and VAN BAALEN, 1974; TISCHNER and HÜTTERMANN, 1978; TISCHNER and SCHMIDT, 1984), aber auch die Stickstoffverfügbarkeit spielt dabei eine wichtige Rolle (TISCHNER and HÜTTERMANN, 1980; JOUANNEAU et al., 1984). Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wird sowohl von Licht, als auch von Phosphat reguliert (BONE, 1971). Eine Arylsulfatase-Aktivität wurde bei der Grünalge Chlorella fusca nur unter Schwefelmangel gemessen, aber nicht in normal gewachsenen Kulturen (NIEDERMEYER et al., 1987).

Wichtig ist es auch zu wissen, welche Enzyme und in welchem Umfang, unter Mangelbedingungen, bei dem Abbau von Proteinen in der Zelle, beteiligt sind. Wesentliches ist in diesem Bereich jedoch noch nicht bekannt.

Zwei intrazelluläre Proteasen wurden für das Heterocysten-bildende Cyanobakterium Anabaena beschrieben (FUOLDS and CARR, 1977; WOOD and HASELKORN, 1977, 1979, 1980; LOCKAU et al., 1988):

1. Eine unspezifische, lösliche Protease, die in vitro die meisten Proteine - außer den Phycobiliproteinen - der Zelle abbaut, die während der Heterocysten-Differenzierung unter N-Mangel verschwinden. Diese Protease ist eine Serin-Protease, spaltet Azocasein und Azocoll, ist calciumabhängig und wird von EDTA inhibiert. In Anwesenheit von Calcium wird sie an eine Phenyl-Sepharose-Säule gebunden (WOOD and HASELKORN, 1977; LOCKAU et al., 1988). Das Molekulargewicht soll nach LOCKAU et al. (1988) ca. 52 K-Dalton betragen. Bezüglich der Anwesenheit des Enzyms in der Zelle gibt es Meinungsverschiedenheiten. Während WOOD and HASELKORN (1979) der Meinung sind, daß die Synthese dieser Protease sofort nach Entfernung des Stickstoffs induziert wird, behaupten LOCKAU et al. (1988), daß die Wachstumsbedingungen keinen Einfluß auf diese enzymatische Aktivität in Extrakten von Anabaena variabilis haben.
2. Die zweite Protease-Aktivität ist membrangebunden und scheint in vitro nur Phycobiliproteine abzubauen (FOULDS and CARR,

1977; WOOD and HASELKORN, 1977, 1979, 1980). Diese Protease existiert auch in Kulturen, die mit NH_4^+ ernährt wurden, aber die Aktivität wird unter N-Mangel 6 bis 10 mal größer (WOOD and HASELKORN, 1979). Die Steigerung der enzymatischen Aktivität wurde auch in normalen Stickstoffkulturen beobachtet, welche mit Glutamin-Synthetase-Inhibitoren (Methionin-Sulfoximin) behandelt wurden (WOOD and HASELKORN, 1980). Chloramphenicol oder CO_2 -Mangel hemmen die Steigerung der enzymatischen Aktivität unter N-Mangel.

Diese membrangebundene Protease wurde von WOOD and HASELKORN (1979) mit nichtionischen Detergentien wie Nonidet P-40 oder Triton X-100 extrahiert, aber wechselhafte Ergebnisse zwangen die Autoren, nach einer anderen Extraktions-Methode zu suchen. Denselben gelang es (1980), das membrangebundene Enzym durch Ultraschallbehandlung der Membranfraktionen nach Einfrieren und/oder Aufbrechen in der French-Press in Lösung zu erhalten.

Es wurde eine direkte Korrelation zwischen dem Abbau von Phycobiliproteinen "in vivo" und der Proteinase-Aktivität dieses Extraktes "in vitro" beobachtet (WOOD and HASELKORN, 1980).

2. Problemstellung

Wie schon von SCHMIDT et al. (1982) beobachtet, wird in Kulturen von Synechococcus 6301 unter Schwefelmangelbedingungen das Phycocyanin abgebaut. Nach Zugabe einer brauchbaren Schwefelquelle wird Phycocyanin sofort wieder synthetisiert und erst wenn der Zellzustand sich normalisiert hat, setzt sich das Wachstum fort.

Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob der Abbau von Phycocyanin unter Schwefelmangel ein enzymatischer Prozeß ist und wenn ja, nach Proteasen zu suchen, sie zu lokalisieren und zu charakterisieren.

Ferner sollten auch die Wirkung des Enzyms gegenüber Phycocyanin untersucht, sowie die dadurch an Phycocyanin entstehenden Veränderungen analysiert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Organismus

Das in dieser Arbeit verwendete Cyanobakterium Synechococcus 6301 stammt aus der Algensammlung von Prof. Dr. Stanier des Pasteur-Instituts-Paris (France).

Die Originalkultur wurde auf Reinheit geprüft, in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml BG-11 Medium (STANIER et al., 1971) angeimpft, 4 Tage lang bei Dauerlicht (15 000 Lux) in einem Schüttler (Fa. FINFORS AG) bei 27 °C inkubiert und bis zum Gebrauch bei Zimmertemperatur unter Dauerlicht aufbewahrt. Alle 5 Wochen wurde die Stammkultur überimpft.

3.2 Nährmedien

Das BG-11 Medium (STANIER et al., 1971) hatte folgende Zusammensetzung:

NaNO ₃	17,5 mM	<u>Spurenelemente:</u>	
K ₂ HPO ₄	0,2 mM	H ₃ BO ₃	46,3 µM
MgSO ₄	0,3 mM	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	9,1 µM
CaCl ₂	0,25 mM	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,77 µM
Citronensäure	0,03 mM	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	1,6 µM
Ammonium Eisen-III-citrat	6 mg/l	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,32 µM
MgCl ₂ / EDTA	je 2,5 µM	Co(NO ₃) ₂ x 6 H ₂ O	0,17 µM
Na ₂ CO ₃	0,4 mM		

Zur Herstellung des Schwefelmangelmediums wurde MgSO₄ durch die gleiche Menge MgCl₂ ersetzt. Andere S-haltige Substanzen wurden beim Animpfen in einer Endkonzentration von 3×10^{-4} M/l durch Sterilfiltration dem autoklavierten Medium zugegeben.

3.3 Anzucht und Bearbeitung von Synechococcus 6301-Kulturen

3.3.1 Anzucht

Für die Massenkulturen von *Synechococcus 6301* wurden 750 ml steriles BG-11 Medium (in 11-Pirsonflaschen enthalten) mit 2 ml Stammkultur geimpft und anschließend 4 Tage lang bei 37 °C unter Dauerlicht (15.000 Lux) und Belüftung angezogen. Die Belüftung wurde mit Preßluft durch Wattefilter durchgeführt. Um grössere Kulturmengen zu erhalten, wurden 10-Liter-Flaschen des gleichen sterilen Mediums mit 50 ml Stammkultur beimpft und 4 bis 5 Tage lang bei 30 °C bei 10.000 Lux und Durchlüftung gezogen.

3.3.2 Ernte

Nach 4 (bzw. 5) Tagen wurden die Kulturen geerntet. Hierzu wurde die Algensuspension 10 min lang bei 5000 U/min zentrifugiert, das Pellet einmal in deionisiertem Wasser gewaschen und nochmal 20 min lang bei 10.000 U/min in einer vorgekühlten Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Das Gewicht dieses Pellets in Gramm entspricht dem Naßgewicht. Das Pellet wurde dann in einem 5-fachen Volumen des Naßgewichtes im Aufbrechpuffer aufgenommen (Aufbrechpuffer: 0,1 M Tris/HCl pH 8; 0,01 M $MgCl_2$; 0,01 M Merkaptotäthanol). Von dieser Algensuspension wurden 0,2 ml für die Chlorophyllbestimmung entnommen und der Rest in einer French Pressure Cell Press bei einem Druck von 12.000 PSI (1 PSI $\approx$ 7 kPa) aufgebrochen. Die aufgebrochenen Zellen wurden unmittelbar danach für 30 min bei 15.000 U/min in einer vorgekühlten Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand hiervon entsprach dem Rohextrakt. Das Pellet wurde in soviel 20 mM Tris/HCl pH 8 Puffer aufgenommen, wie der Rohextrakt in ml ausmachte.

Beides, Pelletsuspension (Membranpartikel) und Rohextrakt (lösliches Material) wurden für kurze Zeit (bis 2 Tage) bei + 4 °C, sonst bei -20 °C für weitere Tests aufbewahrt.

3.3.3 Chlorophyllbestimmung

Der Chlorophyllgehalt in der Kultur wurde nach der Methode von ARNON (1949) bestimmt. Hierzu wurde aus der Zellsuspension direkt vor dem Aufbrechen ein Aliquot (0,2 ml) zweimal 5 min mit Methanol bei 80 °C extrahiert und in der Tischzentrifuge zentrifugiert (10 min bei 4000 U/min). Die vereinigten Überstände wurden auf 10 ml mit Methanol aufgefüllt und die Extinktion bei 663 nm und 645 nm gegen Methanol gemessen.

Aus den erhaltenen Werten kann der Chlorophyllgehalt unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors nach der von ARNON aufgestellten Formel ermittelt werden:

$$\text{mg Chl./ml} = \frac{\text{Verdünnungs-} \times 20,2 \times E_{645} + 8,02 \times E_{663}}{\text{faktor} \quad 1000}$$

3.4 Messung von Endopeptidasen

3.4.1 Azocaseinspaltung (nach Feller and ERISMANN, 1978)

Es wird die Spaltung von Azocasein durch das Enzym gemessen. Das Ausgangsmaterial war eine 0,5 %ige Azocasein-Lösung (Sigma A 2765) in 50 mM Tris/HCl pH 8.

Für den Enzym-Test wurden: 100 µl 1 M Tris/HCl pH 8

200 µl Testmaterial (ohne Salze)

400 µl 0,5 % Azocaseinlösung

einpipettiert und 3 Stunden lang bei 37 °C inkubiert.

Mit 300 µl 15 %iger Trichloressigsäure wurde die Reaktion gestoppt und anschließend die Proben zentrifugiert (Tischzentrifuge).

500 µl des Überstands wurden mit 500 µl 1 N NaOH neutralisiert und gegen den 0-Wert die Absorption bei 440 nm gemessen.

Für den 0-Wert werden statt 200 µl Testmaterial 200 µl bidest. Wasser genommen.

3.4.2 Abbau von Phycocyanin

Phycocyanin von Synechococcus 6301 absorbiert bei 620 nm und dies wurde hier genutzt, um den Abbau zu untersuchen. Es wurde die Absorptionsabnahme bei 620 nm nach der Inkubation von Phycocyanin mit dem enzymatischen Testmaterial (Rohextrakt bzw. Pelletsuspension) gemessen.

Für die Versuchsdurchführung wurden unterschiedliche Mengen an proteolytischem Testmaterial (0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml, 0,8 ml) in 3 ml Endvolumen, 0,1 M Tris/HCl pH 8 gelöst, zu denen je soviel Phycocyaninlösung (DEAE-gereinigt siehe 3.5) zugegeben wurde, wie notwendig war, um eine Ausgangsextinktion bei 620 nm von ca. 1 zu erreichen.

Von den Rohextraktproben wurde sofort die Extinktion bei 620 nm im Spektrophotometer gemessen und die Proben unmittelbar danach in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Pelletproben wurden vor dem Messen zentrifugiert (3000 U/min, 5 min lang) und dann vom Überstand die Optische Dichte (O.D.) bei 620 nm gemessen. Nach Mischen der Pelletproben durch Schütteln wurden diese auch bei 37 °C inkubiert (diese Prozedur muß so schnell wie möglich durchgeführt werden). Nach einer Inkubationszeit von 60 min und nochmaligem Zentrifugieren der Pelletproben wurde die O.D. bei 620 nm noch einmal bestimmt.

Die Differenz zwischen der O.D.₆₂₀ (nm) zur Zeit null und der O.D.₆₂₀ nach 60 min Inkubation wurde als Maß für die proteolytische Aktivität genommen. Da für jede Testprobe verschiedene Mengen von Testmaterial eingesetzt wurden (0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,8 ml), wurde noch der für jede Verdünnung erhaltene Wert auf 100 µl/ml in der Probe umgerechnet und mit den vier Werten ein Mittelwert für die jeweilige Testprobe ermittelt, welcher dem direkt gemessenen Wert entspricht.

3.5. Gewinnung und Anreicherung von Phycocyanin

Phycocyanin wurde aus dem Rohextrakt einer unter normalen Bedingungen gezüchteten und abgeernteten Synechococcus_6301-Kultur gewonnen (3.3).

3.5.1 Polyminfällung

Durch Polyminfällung werden die Chlorophylle im Rohextrakt ausgefällt, während die Phycocyanine in Lösung bleiben. Hierzu wurden dem Rohextrakt 20 µl/ml einer 10 %igen Polymin-Lösung (BASF), pH 7,5 zugegeben, gemischt und in einer vorgekühlten Sorvall-Zentrifuge 15 min lang bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die Chlorophylle wurden so als Pellet abgetrennt und der phycocyaninhaltige Überstand anschließend weiterverarbeitet.

3.5.2 Ammoniumsulfatfällung und Dialyse

Um weitere Begleitproteine zu eliminieren wurde bei dem chlorophyllfreien Rohextrakt eine gestufte Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Der Niederschlag aus 20-50 %iger Ammoniumsulfatsättigung (für 20 min bei 12.000 U/min und 4 °C zentrifugiert) wurde als die phycocyaninhaltige Probe verwendet. Das so präzipitierte Phycocyanin wurde in einem geringen Volumen 20 mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen und zum Entsalzen gegen denselben Puffer (über Nacht, mit einmaligem Pufferwechsel) bei 4 °C dialysiert. Die salzfreie Phycocyaninlösung wurde weiter gereinigt.

3.5.3 Reinigung von Phycocyanin an DEAE-Sephacel

DEAE-Sephacel (Diethyloaminoethylcellulose) ist ein Gel mit positiver Ladung, an das die Carboxylgruppen der Proteine und Aminosäuren unter bestimmten Bedingungen gebunden werden.

Bei Veränderung der Parameter, wie z.B. der Molarität des Puffers, werden diese Bindungen gelöst, so daß Proteine gezielt eluiert werden können.

Phycocyanine, die an DEAE-Sephacel gebunden werden, lassen sich mit einem 0 - 0,5 M NaCl-Gradienten eluieren.

Für die Versuchsdurchführung wurde das fertige DEAE-Sephacel-Gel (Pharmacia) in eine Glassäule (2 x 20 mm) gepackt und das abgesetzte Gel (2 x 10 mm) mit dem 3-fachen Volumen 20 mM Tris/HCl pH 7 (bzw. 8, bzw. 9) gespült. Die Anreicherung von Phycocyanin an DEAE-Sephacel wurde für diese drei pH-Werte ausprobiert, und dabei wurden keine wesentlichen Unterschiede festgestellt.

Nach Auftragen der Probe wurde nochmal mit einem Säulenvolumen desselben Puffers vorgespült, um das ungebundene Material zu entfernen. Anschließend wurde die Probe mit einem 0 - 0,5 M NaCl-Gradienten (in 20 mM Tris/HCl) eluiert. Das Eluat wurde mittels eines Fraktionssammlers (LKB ULTRORAC) in 3 ml-Fraktionen gesammelt, von denen am Spektralphotometer die Absorption bei 620 nm (bzw. 651 nm für APC) gemessen wurde. Es wurden die Fraktionen mit einer E_{620} (bzw. einer E_{651}) größer als 1 gesammelt und vereinigt.

Die im großen Volumen stark verdünnte Phycocyaninprobe wurde durch Ammoniumsulfatfällung (0 - 80 % Sättigung) konzentriert. Das ausgefällte Phycocyanin wurde in wenig Volumen 20 mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen und zum Entsalzen gegen denselben Puffer dialysiert.

Durch spektrophotometrische Messungen wurde die folgende Relation Phycocyanin/Protein ermittelt:

$$E_{620}/E_{280} = 5$$

welche eine gute Anreicherung darstellte (persönliche Mitteilung Dr. H-P. Köstl).

Das so gereinigte Phycocyanin wurde bei -20°C aufbewahrt und für den enzymatischen Abbau "in vitro" verwendet.

Durch diese Methode ließen sich Phycocyanin ($E_{620}\text{ nm}$) und Allophycocyanin ($E_{651}\text{ nm}$) voneinander trennen. Allophycocyaninfraktionen wurden extra gesammelt und ähnlich wie für Phycocyanin beschrieben konzentriert und dialysiert. Der enzymatische Abbau dieses Allophycocyanins wurde ebenfalls getestet.

3.5.4 Isoelektrische Fokussierung

Um nach den Abbauprodukten zu suchen, die nach der Behandlung des Phycocyanins mit Proteasen entstehen, sowie für die Untersuchungen der Schnittstellen des Enzyms war es notwendig, von hochgereinigtem Phycocyanin auszugehen. So wurde ein DEAE-Cellulose-gereinigtes Phycocyanin noch durch Isoelektrische Fokussierung angereichert.

Bei der Isoelektrischen Fokussierung wandern die Proteine unter Stromfluß bis zum isoelektrischen Punkt, wo sie dann liegen bleiben (ANDREWS, 1986).

Die Fokussierung wurde in einem Multiphor der Fa. LKB (2117-501) durchgeführt, wobei durch Wasser gekühlt wurde (ca. 12°C).

Ungefähr 10 g Sephadex G 100 (Pharmacia) wurden in 1000 ml bidest. Wasser gequollen und nach Absetzen des Geles das restliche Wasser bis auf 100 ml dekantiert. Zu den 100 ml gequollenen Gels wurden 2 % Servalyt T 3 - 7 (Serva) zugegeben und im Vakuum (Wasserstrahlpumpe) entgast. Das Gel wurde dann in einen Gelwannenzusatz überführt und durch vorsichtiges Fönen bis kurz vor Erreichen des Crackpoints getrocknet.

Kathode (1 M NaOH) und Anode (1 M H_3PO_4) wurden durch in der jeweiligen Lösung getränkte Papierstreifen an dem entsprechenden Ende der Gelwanne angebracht.

Das Gel wurde vorfokussiert: 1 Stunde bei 200 Volt
2 Stunden bei 400 Volt

Die DEAE-vorgereinigte Phycocyaninprobe wurde bei ca. pH 6 aufgetragen und fokussiert: 1 Stunde bei 200 Volt

1 " bei 300 Volt
bei 400 Volt bis zu konstantem
Stromfluß

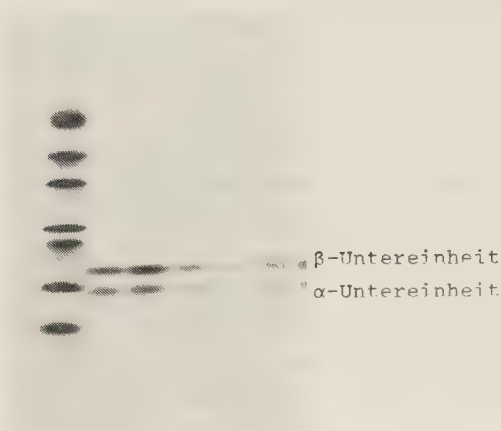
Die farbigen Gelzonen wurden mit Hilfe eines Spachtels herausgekratzt und in Elutionssäulchen überführt. Sie wurden mit je 5 ml H₂O bidest. eluiert und von den gesammelten Proben der pH-Wert, sowie die Extinktion bei 280 nm und 620 nm gemessen.

Es wurde ein isoelektrischer Punkt von ca. 4,0 für das fokussierte Phycocyanin bestimmt. Das Hauptmaximum des Absorptionsspektrums lag bei 617 nm.

Die Phycocyanin-Fraktionen wurden einzeln gegen 20 mM Tris/HCl pH 8 dialysiert, um das Servalyt zu entfernen.

Die Reinheit dieser Fraktionen wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE (3.6.1) geprüft. Für die hier dargestellten Untersuchungen wurden nur die Fraktionen eingesetzt, die an der SDS-PAGE nur die typischen α - und β -Banden von Phycocyanin aufweisen. Die Bahnen 2-6 in Abbildung 1 zeigen die nach der isoelektrischen Fokussierung aufgesammelten Fraktionen. Die zu den Bahnen 2-4 gehörenden Proben wurden als hochgereinigtes Phycocyanin verwendet.

Abbildung 1: SDS-PAGE von isoelektrisch fokussiertem Phycocyanin
(Bahnen 2-6; Bahn 1 = Eichproteine)



3.6 Proteintrennung durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Begriff "Elektrophorese" umfaßt die Migration von geladenen Partikeln unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes. Die Elektrophorese wird von mehreren Faktoren wie Ionenstärke, Typ und Konzentration des Geles, pH-Wert, etc. beeinflusst, welche für eine bessere Trennung gezielt kombiniert werden können (MAURER, 1968; ANDREWS, 1986).

Im Laufe dieser Arbeit wurden Elektrophoresen dreier verschiedener Zusammensetzungen durchgeführt. In allen Fällen wurde die Elektrophorese in einer Vertikalkammer mit Hilfe einer LKB Grundaufbauapparatur und einem Netzgerät der Fa. TSKO (Electrophoresis Power Supply, Model 493) durchgeführt.

3.6.1 SDS-PAGE zur allgemeinen Trennung von Phycocyanin- und Enzymtest-Proben (nach Laemmli, 1970)

Stammlösungen (mit H₂O bidest.)

- (1) SDS-Lösung: (10 %) 10 g Natriumdodecylsulfat (SERVA)
ad 100 ml, filtern (0,2 Millip.), Zi.T.
- (2) Acrylamidlösung: (60 %) Acrylamid (SERVA)
+ 3,2 g N,N'-Methylenbisacrylamid (SERVA)
ad 200 ml im Wasserbad (60 - 70 °C), in
der Wärme filtern, + 4 °C, vor Gebrauch
kristallfrei erwärmen
- (3) Ammoniumperoxidisulfat-Lösung (MERCK): 150 mg
ad 10 ml, frisch ansetzen
- (4) TEMED-Lösung (SERVA): (5 %) 2,5 ml ad 50 ml, Zi.T.
- (5) Laufpuffer: TRIS 3 g/l (0,025 M)
Glycin 14,0 g/l (0,19 M)
SDS 1 g/l (0,1 %)
mit konz. HCl auf pH 8,3 titrieren, + 4 °C
- (6) Laemmli-Auftragspuffer:
- | | | |
|---------------------------------|------|-----------------------|
| SDS | 3 | g |
| Mercaptoethanol | 5 | g |
| Tris | 0,79 | g |
| Glycerin | 10 | ml |
| Bromphenolblau | 5 | ml (2 % wässr.Lösung) |
| ad 100 ml, auf pH 6,8 titrieren | | |
- (7) Färbelösung: Coomassie-Brilliant-Blue R-250 2,5g (SERVA)
- | | | |
|--------------------------|-----|-----------|
| Methanol | 455 | ml |
| Eisessig | 90 | ml |
| H ₂ O bidest. | 455 | ml, Zi.T. |
- (8) Entfärbelösung:
- | | | |
|--------------------------|------|----------|
| Eisessig | 0.75 | l |
| Methanol | 0,5 | l |
| H ₂ O bidest. | 8.75 | l, Zi.T. |

Menüs (im Eisbad in 100 ml Saugflaschen angesetzt, im Vakuum kurz entgast)

Trenngel (5-25 %):	A (5 %)	B (25 %)
1 M Tris/HCl pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml
H ₂ O-bidest.	10,03 "	3,75 "
(1)	0,2 "	0,2 "
(2)	1,67 "	8,4 "
(3)	0,4 "	0,1 "
(4)	0,2 "	0,05 "
	20,0 ml	20,0 ml

Sammelgel (2,95 %):	1 M Tris/HCl pH 6,8	1,25 ml
	H ₂ O-bidest	8,0
	(1)	0,1
	(2)	0,5
	(3)	0,2
	(4)	0,1

Vorbereitung der Proben

Für Proteinlösungen mit 1,2 - 0,8 mg/ml: 20 µl Proteinlösung
+ 100 µl Laemmli-puffer (6)

Für Proteinlösungen unter 0,8 mg/ml: 100 µl Proteinlösung
+ 20 µl 5-fach konzentrierter Laemmli-puffer

Die so vorbereiteten Proben werden 2 min bei 100 °C denaturiert.

Auftragen der Proben

Nach Polymerisieren der Gele und Entfernen des Kammes,
Probenkammern mit Laufpuffer (5) spülen und 20-40 µl
Probe je Kammer auftragen (3-10 µg Protein).

Laufbedingungen

Tagsüber: U = 100 V-Konst., I = 14 mA, t = 1 h, 4 °C Kühlraum
U = 300 " I = 35 ", t = 3 ", " "

Über Nacht: U = 100 V-Konst., I = 14 mA, t = 17 h, 4 °C "

Anfärben der Gele: in Färbelösung (7) 1 h bei 60 °C

Entfärben: in Entfärbelösung (8) durch mehrfachen Wechsel des
Bades innerhalb von 48 Stunden bei 45 °C

Eichproteine (SIGMA, MW-SDS-70L Kit)

<u>Bekannte Proteine</u>	<u>MG (Da)</u>
Albumin, Rind	66.000
Albumin, Ei	45.000
G3PD, Kaninchen Muskel	36.000
Carbonic Anhydrase	29.000
Trypsinogen	24.000
Trypsin-Inhibitor	20.100
α -Lactalbumin	14.200

3.6.2 SDS-PAGE zur Trennung und Visualisierung von Peptiden in einem Molekulargewichts-Bereich von 2.500-17.000 Da. (Phycocyaninabbauprodukte)

Nach Anleitung der Fa. SIGMA (DAYHOFF, 1969; SWANK and MUNKRES, 1971).

Lösungen (mit H₂O-bidest.)

- (1) Acrylamidlösung: 50 g Acrylamid (SERVA)
+ 5 g N,N'-Methylenbisacrylamid (SERVA)
+ 192 g Harnstoff, ad 352 ml, Zi.T.
- (2) 1 M Trizma-Base: 121,1 g Tris (MERCK) ad 1000 ml (1/10
verdünnt in weiteren Lösungen anwendbar)
- (3) Sample Buffer: 2,0 g SDS (SERVA)
+ 96,1 g Harnstoff ad 100 ml
+ 2 ml 2-Merkaptoethanol
+ 0,125 ml konz. H₃PO₄
mit 0,1 M Tris (2) auf pH 6,8 titrieren
ad 200 ml, Zi.T.
- (4) Stock Buffer: 10 g SDS + 200 g Tris ad 650 ml
+ 62,5 ml konz. H₃PO₄, Zi.T.
mit 1 M Tris (2) auf pH 6,8 titrieren
ad 1000 ml, Zi.T.
- (5) TEMED-Lösung: 0,3 ml N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
(Serva) ad 4 ml, frisch vorbereiten
- (6) Ammoniumpersulfat-Lösung (Merck): 200 mg ad 10 ml
frisch vorbereiten
- (7) Fixative-Solution: 15 g 5-Sulphosalicylsäure (Sigma)
+ 50 g Trichloressigsäure (Roth) ad 500 ml
- (8) Staining-Solution: 125 g Coomassie Brilliant Blue R
(SERVA) in 500 ml Lösung (9) lösen,
filtrieren, braune Flasche, Zi.T.
- (9) Destaining-Solution: 50 ml Methanol + 75 ml Eisessig
ad 1000 ml, Zi.T.
- (10) Saturated-Bromphenol-Blue-Solution: 40 mg ad 10 ml,
Zi.T.

Menüs (im Vakuum kurz entgasen)

	<u>Trenngel 12,5 %</u>	<u>Sammelgel (3 %)</u>
(1) Acrylamid-L.	35,2 ml	4,2 ml
(4) Stock Buffer	4 ml	1 ml
(5) TEMED-L.	0,4 ml	0,1 ml
(6) Amm.Persulfat-L.	0,4 ml	0,1 ml

Probenvorbereitung Testproben zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml in Sample-Buffer (3) vorbereiten, 15 min bei 60 °C inkubieren, nach Abkühlen der Proben je 50 µl/ml Bromph.Blue (10) zugeben, bei -20 °C aufbewahren

Auftragemenge 20 µl je Bahn

Laufbedingungen Laufpuffer = 1/10 verdünnter Stock-B. (4)
U = 100 Volt-Konst., I = 20 mA, t = 17 h,
4 °C

Färben und Entfärben der Gele

Gele 5 h in Lösung (7) fixieren,
1 h in Lösung (8) bei 60 °C färben,
entfärben in Lösung (9) durch mehrfachen
Wechsel des Bades innerhalb von 48 Stunden
bei 45 °C

Eichproteine (SIGMA, MW-SDS-17 KIT)

<u>Polypeptide</u>	<u>MG (Da)</u>
Myoglobin (Polyp. backbone)	16.950
Myoglobin (Fragment I+II)	14.400
Myoglobin (Fragment I)	8.160
Myoglobin (Fragment II)	6.210
Myoglobin (Fragment III)	2.510

Auswertung (von 3.6. 1 und 2)

Mit Hilfe von SDS-Eichproteinen läßt sich das Molekulargewicht von unbekannten Proteinen bestimmen (WEBER and OSBORN, 1969). Aus den Laufstrecken, die gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichtes der Eichproteine aufgetragen werden, läßt sich eine Eichgerade bestimmen. Aus dieser Eichgeraden kann das Molekulargewicht unbekannter Proteine in einem Gel abgelesen werden.

Für die Ermittlung der Protein-Mengenverhältnisse in einer Probe, wurden die gefärbten Gele densitometrisch mit einem Vitatron TLD 100 Densitometer ausgewertet und der Flächeninhalt der Peaks nach der SIMPSON-Regel berechnet.

Zur Dokumentation wurden die Gele fotografiert und auf Papier oder zwischen zwei Folien getrocknet.

3.6.3 SDS-PAGE zur Trennung von Enzymtest-Proben für die Sequenzierung der Schnittstelle am Phycocyanin

Diese Versuche wurden in den Labors des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Genzentrum, Martinsried) durchgeführt unter der Leitung von Dr. Lottspeich (ECKERSKORN et al., 1988).

SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970). Es wurden hier nur Reagenzien der Fa. Bio-Rad eingesetzt

Lösungen: L(1) 30 % Acrylamid 30 g
 0,4 % Bisacrylamid 0,4 g
 ad 100 ml mit H₂O-bidest.

L(2) 1,5 M Tris 90,85 g
 8 mM EDTA 1,49 g
 0,4 % SDS 2,00 g
 ad 500 ml mit H₂O-bidest., pH 8,8

L(3) 0,5 M Tris	6,05 g
8 mM EDTA	0,298 g
0,4 % SDS	0,4 g
ad 100 ml mit H ₂ O.bidest., pH 6,8	

Elektrodenpuffer

0,3 % Tris	30,0 g
1,44 % Glycerin	144,0 g
0,1 % SDS	10,0 g
ad 1 l mit H ₂ O-bidest, pH 8,3	

Menüs: (im Vakuum kurz entgasen)

	<u>Trenngel (15 %)</u>	<u>Sammelgel</u>
L(1)	15 ml	2,4 ml
L(2)	7,5 ml	-
L(3)	-	4 ml
H ₂ O-bidest	7,5 ml	6,8 ml
APS 1 % (100mg/ml)	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

Größe der Gele: 10 x 10 cm

Aufgetragene Proteinmenge: ca. 2-3 mg

Laufbedingungen: U = 70 V-konstant, 17 h, + 4 °C

<u>Eichproteine:</u>	<u>Bekannte Proteine</u>	<u>MG (Dalton)</u>
	Phosphorylase b	92.500
	Bovine serum albumin	66.000
	Ovalbumin	45.000
	Carbonic anhydrase	31.000
	Soy-bean trypsin inhibitor	21.500
	Lysozyme	14.400

Electroblotting

Für das Electroblotting der wie oben SDS-PAGE-getrennten Proteine wurden Blätter (der Größe nach dem Gel angepaßt) aus Filterpapier (Schleicher und Schüll) sowie aus silikonisierter Glasfaser (SGF) zurechtgeschnitten. Die Filterpapierblätter wurden 3 mal für 15 min in Transfer-Puffer (50 mM Borsäure (MERCK), 20 % Methanol, mit 2 M NaOH auf pH 9,0 titriert) eingetaucht. Die SGF-Blätter wurden 10 min in Aceton gewaschen und 20 min (mit 3-maligem Pufferwechsel) im Transfer-Puffer equilibriert.

Unmittelbar nach der Elektrophorese wurde das "Electroblotting" durchgeführt und dafür folgendes "Paket" von unten (Anode) nach oben (Kathode) aufgebaut:

- 3 Lagen Filterpapier in Transfer-Puffer eingetaucht (3 mm)
- das equilibrierte SGF-Blatt
- das Polyacrylamid-Gel
- 3 Lagen Filterpapier in Transfer-Puffer eingetaucht (3 mm)

Mit Hilfe einer Glasrolle wurden nach jeder Lage die Luftblasen entfernt. Die Elektroden wurden in H₂O-bidest. gespült.

Das Electroblotting wurde unter konstantem Stromfluß von 190 mA für 6 Stunden durchgeführt (semi dry apparatus, LKB, Bromma).

Coomassie-Blue-Färbung

Die auf SGF-Platten transferierten Proteine wurden in einem Färbegrad [0,1 % (w/v) Coomassie-Blau R-250 (Serva), 40 % (v/v) Methanol, 10 % Essigsäure] 2 min lang gefärbt. Die SGF-Platten wurden mit H₂O-bidest. von Farbüberschuß befreit und anschließend in der Entfärbelösung (Wasser/Methanol/Essigsäure, 50/40/10, v/v/v) entfärbt.

Die entfärbten SGF-Platten wurden noch mit H₂O-bidest. gespült und unmittelbar danach getrocknet.

Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenz des Phycocyaninabbaupeptids

Die SDS-Page und das Electroblothing (wie oben beschrieben) einer Enzymtest-Probe (hochgereinigtes Phycocyanin + gereinigter Enzymextrakt) ergaben eindeutig die α - und β -Banden von Phycocyanin, plus einer starken Abbaubande bei einem MG von ca. 8.300 Dalton (Abb. 21). Von dieser Abbaubande wurde eine N-terminale Sequenzierung durchgeführt, um die Schnittstelle am Phycocyanin durch den Enzymextrakt zu identifizieren.

Für die Sequenzierung wurde die typische Phycocyaninabbaubande aus der SGF-Platte herausgetrennt und an der Patrone eines "Gas-Phase-Sequenzers" (470 A, Applied Biosystems) angebracht. Das herausgetrennte SGF-Teil wurde mit einem organischen Lösungsmittel (Acetonitril bzw. Methanol) angefeuchtet und mit 20 μ l Polybrene in Wasser (Biobrene) übergossen. Nach Montieren der Patrone an dem Sequenzer wurde der Edman-Abbau nach dem Standard-Program 03CPTH durchgeführt.

3.7 G e r ä t e

Algenanzuchtkästen: Schüttler der Fa. Finfors AG;

- Sonderanfertigung eines Kniese-Kulturapparates für 1 l-Pirsonflaschen, $\varnothing$ 6,5 cm, Beleuchtungsstärke 15.000 Lux;
- Sonderanfertigung eines Kulturapparates für 10 l-Flaschen, $\varnothing$ 30 cm, Beleuchtungsstärke 10.000 Lux.

Zentrifugen: Labofuge GL von Heraeus-Christ (Osterode);

- Runne Zentrifuge (Runne, Heidelberg);
- WKF-Zentrifuge G 50 K, Rotor 8x38 ml / 20000 UpM/rpm (Brandau, Darmstadt);
- Sorvall RC-5 B, Refrigerated Superspeed Centrifuge, Rotor SS-34 Newton-Conn USA (Du Pont Instruments, Bad Nauheim).

Gefrierschrank: Liebherr GS 3083-1.

French-Presse: French Pressure Cell Press (American Instrument Company, Silver Springs, Maryland, USA).

Ultraschallgerät: Micro tip SONIFIER (Cell disruptor) B-12
(Branson SONIC Power Company).

Gefriertrockner: Dieter Piatkowski, Model 15 K-B (München).

Waagen: Feinwaage der Firma Sartorius;

- Analysenwaage METTLER H 54 (Mettler, Gießen).

Wasserbad: Thermomix 1420 (Braun, Melsungen).

pH-Meter: Digital pH-Meter 646 (Bachofer, Reutlingen).

Photometer: Beckman Spektralphotometer DU-7,

Bildschirm Ausdruck möglich über den angeschlossenen

Hewlett-Packard Plotter 2672 (Corvallis, USA).

Für die Säulentrennung:

- Peristaltic Pumpe 3600 /Colora Messtechnik GMBH (Lorch/Württ);

- Fraktionssammler ULTRORAC 7000 der Fa. LKB;

- Schreiber, LKB-UBICOR II, Typ 6520-4.

Für die Elektrophorese:

- LKB Grundaufbauapparatur (Vertikalkammer);

- LKB-Multiphor 2117-501 für die isoelektrische Fokussierung;

- Netzgerät Model 493 der Fa. ISCO (Lincoln, USA);

- Scanner: Densitometer Vitatron TLD 100.

Für die Sequenzierung:

- LKB-Electroblotter (Bromma);

- Gas-Phaser-Sequencer 470 A (Applied Biosystems).

3.8 Chemikalien

D-Cystein, DL-Homocystein, Äthansulfonsäure, Äthansulfonsäure-Natriumsalz, Azocasein, Glycin, 5-Sulphosalicylsäure sowie die für die Elektrophorese verwendeten Eichproteine stammten von Sigma (München). L-T-4-C stammt von der Fa. Fluka (Buchs, Schweiz), Polymin von BASF. Ammoniumsulfat, Natriumdodecylsulfat, Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, TEMED, SDS, Coomassie Brilliant-Blue und Servalyt wurden von Serva (Heidelberg) bezogen. Von der Fa. Roth (Karlsruhe) stammten Methanol, Trichloressigsäure, HCl, Glycerin und Eisessig. DEAE-Cellulose und Sephadex G 100 waren Produkte der Fa. Pharmacia. Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien stammen von der Fa. Merck (Darmstadt).

4. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

4.1. Modifikation des Originalmediums zur Herstellung einer S-Mangel-Kultur mit bester "Phycocyaninabbauender" Aktivität

4.1.1 Entwicklung einer normalen Synechococcus 6301-Kultur, sowie Vergleiche unter Schwefelmangel und nach Sulfatzugabe

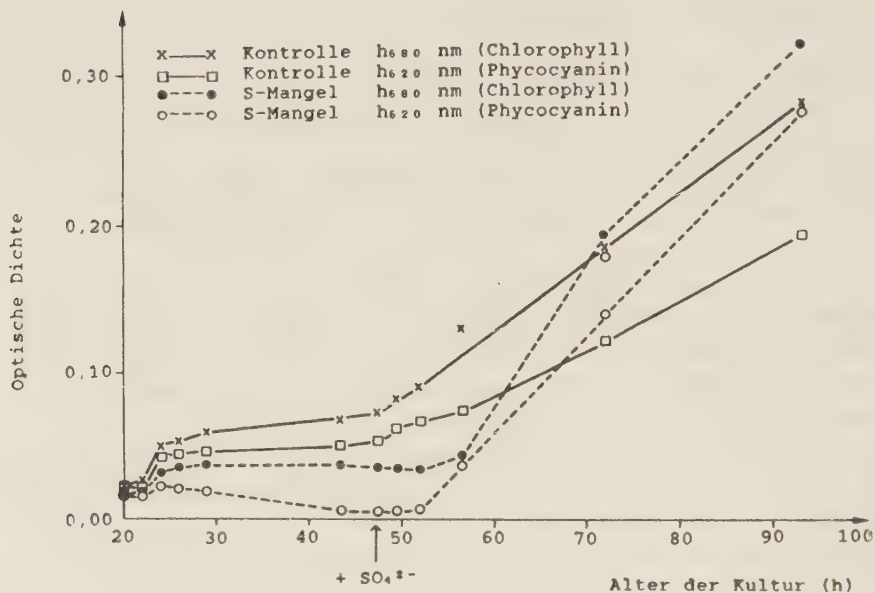
Um Veränderungen bezüglich der Schwefelversorgung in einer Synechococcus 6301-Kultur durchführen zu können war es wichtig, die Entwicklung einer Kultur, sowohl unter normalen Bedingungen als auch unter S-Mangel zu verfolgen und die Regenerationszeit nach Zugabe von Sulfat zu der Mangelkultur zu bestimmen.

Untersucht wurde eine normale Synechococcus 6301-Kultur parallel zu einer Schwefelmangelkultur (MgCl_2 anstatt MgSO_4 , siehe Medien). Um die Entwicklung der Kulturen zu verfolgen, wurden in bestimmten Zeitabständen Aliquots entnommen und davon die Absorption bei 680 nm (als Maß für Chlorophyll) sowie bei 620 nm (als Maß für Phycocyanin) gemessen. In Abbildung 2 sind diese Daten für beide Kulturen graphisch dargestellt.

Nach 20 Stunden Wachstum sind die Daten für beide Kulturen praktisch gleich. Ab diesem Punkt werden die Unterschiede mit der Zeit größer, was ein Hinweis dafür ist, daß das mit dem Inokulum zugegebene Sulfat nach etwa 20 Stunden aufgebraucht ist. Bei den sulfatgezogenen Algen hatten nach 49 Stunden die Mengen an Phycocyanin und Chlorophyll parallel zugenommen, während bei der S-Mangelkultur eine Abnahme an Phycocyanin sowie konstante Raten an Chlorophyll beobachtet werden konnten.

An diesem Punkt (in der 49. Stunde) wurde der S-Mangelkultur 3×10^{-4} M/l Na_2SO_4 zugegeben. Nach einer Lag-Phase von etwa 5 Stunden steigt der Phycocyaningehalt drastisch an, und erst nach ca. 10 Stunden auch der Chlorophyllgehalt.

Abbildung 2: Entwicklung einer Synechococcus 6301-Kultur mit Sulfat, ohne Sulfat und nach Zugabe von Sulfat zu der S-Mangel Kultur



4.1.2. Wachstum von Synechococcus 6301 auf verschiedenen Schwefelquellen

Synechococcus 6301 kann zahlreiche S-Verbindungen als einzige Schwefelquelle nutzen, aber nur bei einigen davon erfolgt gutes Wachstum, vergleichbar mit dem Wachstum im Sulfatmedium (SCHMIDT et al., 1982). Andere schwefelhaltige Substanzen erlauben ein Wachstum, jedoch hat die Kultur typische Mangelmerkmale.

Auf der Suche nach einer S-Mangelkultur mit relativ guter Ausbeute wurde Synechococcus 6301 auf mehreren S-haltigen Substanzen als einzige Schwefelquelle kultiviert, wobei 0,3 mM der jeweiligen S-Verbindung den normalen Sulfatgehalt in BC-11 Medium (3.2) ersetzte.

Nach 4 Tagen Inkubation wurden die Kulturen abgeerntet und jeweils auf Naßgewicht und Chlorophyllgehalt untersucht, sowie vom Rohextrakt die Absorption bei 620 nm (Phycocyanin) und 680 nm (Chlorophyll) gemessen.

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse für die untersuchten Schwefelquellen dargestellt.

Tabelle 1: Getestete Schwefelquellen mit Ergebnissen

Schwefelquelle	Naßgewicht g	Chlorophyll mg/ml	O.D. Rohextrakt	
			620	680
MgSO ₄ = Kontrolle	1,07	0,310	2,76	2,70
MgCl ₂ (S-Mangel)	0,48	0,083	0,40	0,61
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	1,05	0,258	2,81	2,11
Äthansulfonsäure (CH ₃ -CH ₂ -SO ₃ H)	0,68	0,049	0,48	1,08
Äthansulfonsäure- Natriumsalz (CH ₃ -CH ₂ -SO ₃ -Na ⁺)	0,68	0,063	0,54	0,92
DL-Homocystein [HSCH ₂ -CH ₂ -CH(NH ₂)- -COOH]	0,71	0,121	0,67	0,88
L-Thiazolidin- 4-Carbonsäure $ \begin{array}{c} \text{S} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH} \end{array} $	0,86	0,142	0,95	1,18

Die hier angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mehreren unter denselben Bedingungen gewachsenen Kulturen.

Während Natriumsulfat mit der Kontrolle (MgSO₄) vergleichbare Ergebnisse aufweist, erlaubt D-Cystein kaum ein Wachstum. Die Daten

aus Äthansulfonsäure und Äthansulfonsäure-Natriumsalz sind etwa mit denen aus S-Mangelkulturen (MgCl_2) zu vergleichen. DL-Homocystein und L-Thiazolidin-4-Carbonsäure zeigten die gewünschten Zwischenwerte. So wurden für das Naßgewicht 0,71 g bzw. 0,86 g gegenüber 1,07 g für die Kontrolle und 0,48 g für S-Mangelkulturen gemessen.

Bezüglich des Chlorophyllgehaltes in den Kulturen lagen die Werte bei 0,121 bzw. 0,142 mg/ml gegenüber 0,310 mg/ml bei der Kontrolle und 0,083 mg/ml bei S-Mangel. Die Absorptionen durch den Rohextrakt lagen für Phycocyanin (620 nm) bei 0,67 bzw. 0,95 gegenüber 2,76 und 0,40 in der Kontrolle und S-Mangel, für Chlorophyll (680 nm) bei 0,88 bzw. 1,18 gegenüber 2,70 und 0,61 in der Kontrolle und bei S-Mangel.

Somit erweisen sich DL-Homocystein und L-Thiazolidin-4-Carbonsäure als geeignete S-Quellen für weitere Untersuchungen.

4.1.3 Proteolytische Aktivität in verschiedenen Kulturen von Synechococcus 6301

Die proteolytische Aktivität "in vitro" wurde an vier bezüglich der Schwefelquelle unterschiedlich gezogenen Synechococcus 6301-Kulturen untersucht: MgSO_4 als Kontrolle,
ohne Sulfat als S-Mangel,
DL-Homocystein und L-Thiazolidin-4-Carbonsäure (L-T-4-C) als Mangelkulturen
mit besserer Ausbeute (4.1.2).

Die enzymatische Aktivität wurde sowohl vom Rohextrakt als auch von der Pelletsuspension (3.3.2) der jeweiligen Kultur untersucht.

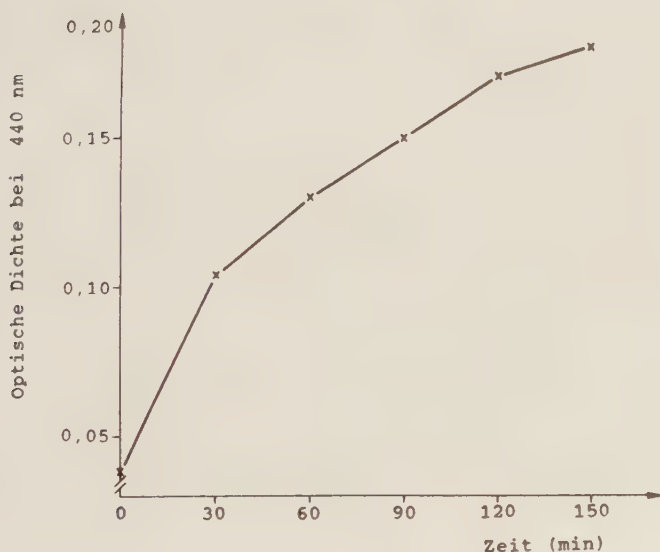
Die Messungen wurden mittels zweier unterschiedlicher Methoden durchgeführt, nämlich der Spaltung von Azocasein (nach FELLER and ERISMANN, 1978) und dem Abbau von Phycocyanin.

4.1.3.1 Azocaseinspaltung

Bei der Spaltung von Azocasein handelt es sich um eine übliche Methode zur Messung von Endopeptidasen (FELLER and ERISMANN, 1978; STREIT and FELLER, 1983).

Das Substrat Azocasein ist ein Casein, an das mehrere farbige Liganden gekoppelt sind. Durch den Angriff des Enzyms wird das Casein-Peptid an mehreren Stellen gespalten, so daß Azocasein-Chromophor-Bruchstücke freigesetzt werden. Nach TCA-Fällung läßt sich im Überstand die Zunahme dieser farbigen Bruchteile am Spectrophotometer bei 440 nm messen. Der Test mit Azocasein gibt ein Maß für die gesamten in den Trichloressigsäure-Überstand gelangten Aminosäuren und nicht nur für die freien Aminogruppen (FELLER and ERISMANN, 1978). Der Verlauf einer solchen Reaktion (E_{440} nm gegen die Zeit) ist in Abbildung 3 dargestellt. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus Parallelversuchen mit Pelletsuspensionen aus zwei Kulturen.

Abbildung 3: Spaltung von Azocasein durch Pelletsuspensionen von S-Mangel-gezogenen *Synechococcus* 6301-Kulturen



Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 3.4.1 beschrieben, mit der jeweiligen Pelletsuspension als Enzymzusatz und mit Messungen in Zeitabständen von 30 min. Es zeigte sich eine größere Aktivität für die ersten 30 min.

4.1.3.2 Ergebnisse zur Azocaseinspaltung

Die Ergebnisse der Azocaseinspaltung durch Pelletsuspension bzw. Rohextrakt der vier mit verschiedenen Schwefelquellen gezogenen Kulturen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die beim Enzymtest direkt gemessenen Werte von parallel gezogenen Kulturen wurden auf den Chlorophyllgehalt in der entsprechenden Kultur bezogen, um eine Relation zwischen proteolytischer Aktivität und Wachstum festzustellen.

Azocaseinspaltung ließ sich im Prinzip sowohl für die Pelletsuspension als auch für den Rohextrakt beobachten, jedoch ging die Aktivität beim Rohextrakt praktisch verloren, wenn dieser gegen 20 mM Tris/HCl pH 8 dialysiert wurde. Die Aktivität der Pelletsuspension blieb dabei erhalten. Die Zugabe von Proteasekofaktoren wie Magnesium, Mangan und/oder L-Cystein zum Enzymtest mit dem dialysierten Rohextrakt hat die verlorene Aktivität nicht wiederhergestellt. So müssen die Enzyme, die in beiden Fällen an der Azocaseinspaltung beteiligt sind, unterschiedlich sein.

Bezüglich der Aktivität in den unterschiedlichen Schwefelkulturen zeigten sich für DL-Homocystein die besten Werte, gefolgt von L-Thiazolidin-4-Carbonsäure, sowohl für die Pelletsuspension als auch für den Rohextrakt vor dem Dialysieren.

Auch in den $MgSO_4$ -gezogenen Kulturen wurde proteolytische Aktivität gegenüber Azocasein gefunden, obwohl die Werte ca. $1/2$ kleiner waren als in der DL-Homocystein-Kultur.

Die ohne Sulfat gezogenen Algen zeigten keine schlechten relativen Aktivitäten, aber da das Wachstum sehr schwach wird, war diese Kultur für weitere Untersuchungen auf Grund geringer Ausbeute nicht zu empfehlen.

Tabelle 2: Azocaseinspaltung durch Rohextrakt bzw. Pelletsuspension aus Kulturen die auf verschiedenen Schwefelquellen gezogenen wurden

Kultur	Vers. Nr.	Pelletsuspension E ₄₄₀ nm/Chl.		Rohextrakt E ₄₄₀ nm/Chl.		Chlorophyll mg/ml
		undial.	dialys.	undial.	dialys.	
<u>MgSO₄</u>	1	0,82	0,80	1,34	0,28	0,117
	2	1,11	1,47	1,51	0,45	0,199
	3	0,18	0,26	0,84	0,09	0,457
	4	0,26	0,19	0,84	0,06	0,587
	5	0,77	-	0,75	-	0,234
Arit.Mittel		0,63	0,68	1,06	0,22	
<u>S-Mangel</u>	1	0,88	1,22	0,88	0,23	0,060
	2	0,66	0,64	1,42	0,15	0,106
	3	1,45	1,17	1,50	0,13	0,060
	4	1,25	1,06	1,54	0,19	0,104
	5	1,43	-	1,73	-	0,082
Arit.Mittel		1,13	1,16	1,41	0,18	
<u>DL-Homocys.</u>	1	1,78	1,20	2,53	0,13	0,120
	2	1,82	2,20	1,95	0,19	0,154
	3	1,32	1,33	0,68	0,06	0,172
	4	1,06	2,18	1,59	0,33	0,116
	5	1,58	-	1,27	-	0,158
Arit.Mittel		1,52	1,73	1,60	0,18	
<u>L-T-4-C</u>	1	1,04	1,09	1,73	0,14	0,118
	2	1,33	1,28	1,29	0,13	0,188
	3	1,29	0,89	0,82	0,12	0,183
	4	1,15	-	0,80	0,12	0,180
	5	1,20	-	1,96	-	0,133
Arit.Mittel		1,20	1,09	1,32	0,13	

4.1.3.3 Phycocyaninabbau

Um wirklich die Protease(n) zu erfassen, die "in vivo" den Abbau von Phycocyanin unter Schwefelmangel verursachen, wurde sowohl mit dem Rohextrakt als auch mit der Pelletsuspension für die vier bezüglich der Schwefelquelle unterschiedlich gezogenen Kulturen der Phycocyaninabbau "in vitro" untersucht.

Phycocyanin aus Synechococcus 6301 hat sein Absorptions-Maximum bei einer Wellenlänge von 620 nm. So wurde hier die Veränderung der optischen Dichte (O.D.) bei dieser Wellenlänge während der Inkubation von Phycocyanin mit dem Testmaterial gemessen.

Die Versuchsdurchführung ist im Punkt 3.4.2 von "Material und Methoden" beschrieben.

Durch Messungen in bestimmten Zeitabständen konnte eine Zeitkinetik dieser Reaktion verfolgt werden. Hierzu wurde die O.D.₆₂₀ nm der angesetzten Proben bei den Zeiten: t_0 , 10 min, 20 min, 40 min und 60 min gemessen. Bei den Rohextrakt-Proben wurden diese zu den gegebenen Zeiten aus dem Wasserbad genommen, direkt gemessen und dann weiter inkubiert. Die Pelletsuspensions-Proben mußten jedesmal zentrifugiert werden.

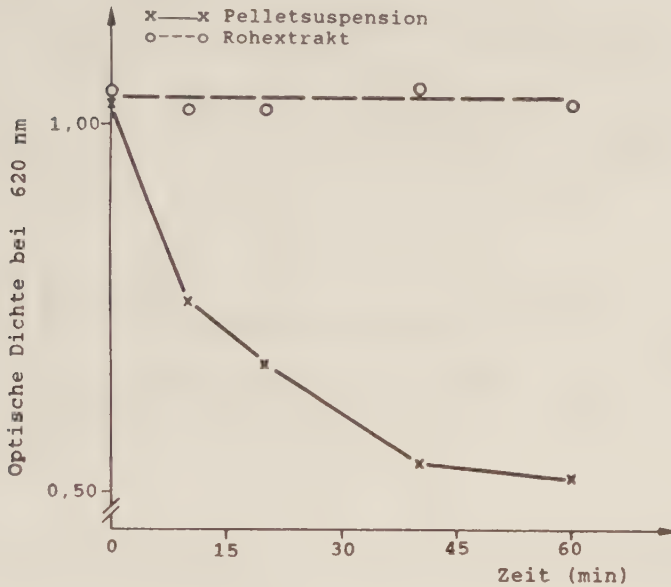
Der Verlauf einer solchen Reaktion ist in Abbildung 4 als O.D. bei 620 nm in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Die hier dargestellten Werte sind die Ergebnisse des Phycocyaninabbaues durch Rohextrakt bzw. Pelletsuspension aus Algen, die auf L-Thiazolidin-4-Carbonsäure gewachsen waren. Mit den Extrakten anderer Kulturen ergaben sich ähnliche Bilder.

Die Reaktion mit der Pelletsuspension verläuft zu Beginn schnell und verlangsamt sich mit der Zeit. Ähnliches wurde auch bei der Spaltung von Azocasein beobachtet (Abb. 3).

Der Rohextrakt zeigte kaum Aktivität bezüglich Abbau von Phycocyanin.

Abbildung 4: Abbau von Phycocyanin durch Pelletsuspension bzw. Rohextrakt aus einer auf L-T-4-C gezogenen *Synechococcus* 6301-Kultur



4.1.3.4 Ergebnisse zum Phycocyaninabbau

Wie bei den Ergebnissen der Azocaseinspaltung wurden die direkt gemessenen Werte des Phycocyaninabbaues auf die Chlorophyllgehalte in der entsprechenden Kultur bezogen, um eine Relation zwischen Wachstum und proteolytischer Aktivität festzustellen. Die Ergebnisse des Phycocyaninabbaues durch die verschiedenen Pelletsuspensionen sind in Tabelle 3 dargestellt. Für den Rohextrakt wurden keine Ergebnisse ermittelt, weil sie, wie oben erwähnt, nicht signifikant waren.

Tabelle 3: Phycocyaninabbau durch die Pelletsuspension aus Kulturen, die unter verschiedenen Schwefelquellen gezogenen wurden (Abnahme der O.D.₆₂₀ nm auf Chlorophyll bezogen)

Kultur	Versuchs-Nr.	Pelletsuspension Abnahme E ₆₂₀ /Chl.		Chlorophyll mg/ml
		vor Dial.	dialysiert	
<u>MgSO₄</u>	1	0,90	1,61	0,117
	2	1,26	1,00	0,199
	3	0,33	0,46	0,457
	4	0,58	0,39	0,587
	5	0,73	-	0,234
Arit.Mittel		0,76	0,87	
<u>S-Mangel</u>	1	0,83	1,83	0,060
	2	1,70	1,28	0,106
	3	1,17	1,33	0,060
	4	2,13	1,19	0,104
	5	1,60	-	0,082
Arit.Mittel		1,49	1,41	
<u>DL-Homocyst.</u>	1	1,37	1,64	0,120
	2	1,75	1,49	0,154
	3	0,59	0,59	0,172
	4	1,97	1,18	0,116
	5	1,24	-	0,158
Arit.Mittel		1,39	1,23	
<u>L-T-4-C</u>	1	1,27	1,70	0,118
	2	1,54	1,12	0,188
	3	0,83	0,89	0,183
	4	1,67	1,24	0,180
	5	1,15	-	0,133
Arit.Mittel		1,29	1,20	

Die phycocyaninabbauende Aktivität durch die Pelletsuspension blieb, wie bei Azocaseinspaltung, auch hier nach dem Dialysieren für alle getesteten Kulturen bestehen.

Bezüglich der enzymatischen Aktivität in den mit verschiedenen S-Quellen gezogenen Kulturen lassen sich auch hier gute Aktivitäten für DL-Homocystein (1,39) und L-Thiazolidin-4-Carbonsäure (1,29) erkennen, die etwa doppelt so groß sind wie bei der Kontrolle (0,76). Die Kulturen ohne Sulfat zeigten auch gute Aktivitäten (1,49), aber wie schon erwähnt, ist das Wachstum dieser Kulturen sehr gering.

4.1.3.5 Vergleich der durch Phycocyaninabbau bzw. Azocaseinspaltung erhaltenen Mittelwerte

An den in Tabelle 4 dargestellten Ergebnissen läßt sich erkennen, daß die enzymatische Aktivität "in vitro" gegenüber Azocasein bzw. Phycocyanin membrangebunden ist.

Tabelle 4: Mittelwerte der Ergebnisse vom Phycocyaninabbau (Abnahme $E_{620 \text{ nm}} / \text{Chl.}$) sowie von der Azocaseinspaltung (Zunahme $E_{440 \text{ nm}} / \text{Chl.}$)

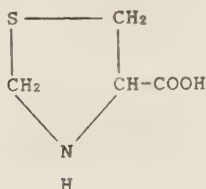
Kultur	PC-Abbau durch Pelletsuspension		Azocaseinspaltung durch Pelletsuspension + Rohextrakt			
	vor Dial.	dialy.	vor Dial.	dialy.	vor Dial.	dialy.
MgSO ₄	0,76	0,87	0,63	0,68	1,06	0,22
S-Mangel	1,49	1,41	1,13	1,16	1,41	0,18
DL-Homocystein	1,39	1,23	1,52	1,73	1,60	0,18
L-T-4-C	1,29	1,24	1,20	1,09	1,32	0,13

Daß diese membrangebundene enzymatische Aktivität "in vitro" Phycocyanin abbaut, läßt darauf schließen, daß sie auch "in vivo" unter S-Mangel das Phycocyanin abbauen könnte.

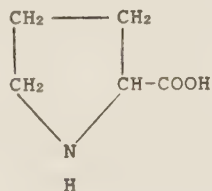
4.1.4 L-Thiazolidin-4-Carbonsäure als Schwefelquelle

Als Kulturen mit gutem Wachstum und guter enzymatischer Aktivität haben sich die DL-Homocystein- und L-Thiazolidin-4-Carbonsäure-Kulturen erwiesen. Da die Handhabung von L-T-4-C einfacher ist als bei DL-Homocystein und zudem L-T-4-C günstiger zu bekommen ist, wurde diese Schwefelquelle für weitere Untersuchungen verwendet.

L-T-4-C ist ein Analogon von L-Prolin, in dem die 4-Methylen-Gruppe durch Schwefel ersetzt ist.



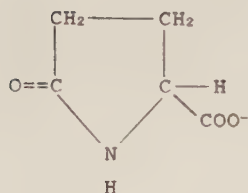
L-T-4-C



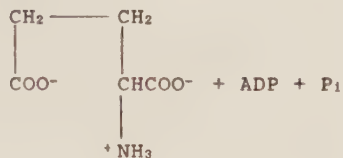
L-Prolin

L-2-Oxothiazolidin-4-Carboxylat, ein Analogon des 5-Oxoprolins, wird von der Zelle aufgenommen und von der 5-Oxo-L-Prolinase (die die Reaktion 5-Oxo-L-Prolin zu L-glutamat in Abhängigkeit von ATP katalysiert) als Substrat anerkannt und in einer ATP-abhängigen Reaktion zu Cystein und ADP abgebaut (Abbildung 5 ; WILLIAMSON and MEISTER, 1981).

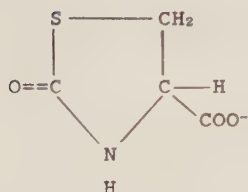
Abbildung 5 : Durch 5-Oxo-L-Prolinase katalysierte Reaktionen
(WILLIAMSON and MEISTER, 1981)



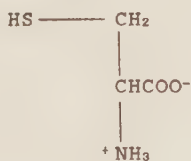
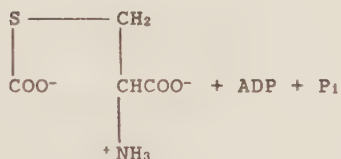
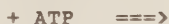
5-Oxo-L-Prolin



L-Glutamat



L-2-Oxothiazolidin-
4-Carboxylat



L-Cystein

Auf ähnliche Weise könnte auch L-T-4-C zu Cystein abgebaut werden und dieses dann bei Aufbaureaktionen in der Zelle für den Schwefel-Stoffwechsel genutzt werden.

Bei der Synthese von Glutathion ist Cystein der limitierende Faktor (GIOVANELLI et al., 1978). So kann der Glutathiongehalt in der Zelle durch Erhöhung des Cysteinspiegels erhöht werden (HEINJE et al., 1976; GEKELER, 1988). Der gleiche Effekt wurde durch Zugabe von L-Oxothiazolidin-4-Carboxylat beobachtet, sowohl beim Leber-Glutathion bei Mäusen (WILLIAMSON and MEISTER, 1981) als auch bei Suspensionskulturen von *R. serpentina* und *P. aureus* (GEKELER, 1988).

4.1.5 Eigenschaften der membrangebundenen enzymatischen Aktivität

4.1.5.1 Veränderung der enzymatischen Aktivität mit dem Alter der Kultur

Um die Veränderungen der enzymatischen Aktivität im Laufe der Entwicklung einer Synechococcus 6301-Kultur zu verfolgen, wurde eine 10 Liter-S-Mangel-Kultur mit L-T-4-C als Schwefelquelle angesetzt, von der täglich ein Liter abgeerntet wurde. Von der jeweils geernteten Probe wurde dann das Naßgewicht und der Chlorophyllgehalt gemessen (um den Zustand der Kultur zu erfassen) und die Pelletsuspension auf enzymatische Aktivität gegenüber Azocasein (Zunahme der O.D.₄₄₀ nm) und Phycocyanin (Abnahme der O.D.₆₂₀ nm) untersucht.

In Tabelle 5 sind die Mittelwerte von drei Versuchsreihen dargestellt.

Die phycocyaninabbauende Aktivität steigt mit dem Alter der Kultur an, obwohl am 3. und 4. Tag die Ergebnisse (0,26 bzw. 0,25) praktisch gleich sind.

Bei der Azocaseinspaltung wurde nach dem 3. Tag (0,22) keine Steigerung der Aktivität mehr beobachtet; die Werte am 4. und 5. Tag sind sogar kleiner als am 3. Tag.

Das Naßgewicht (in g/l) stieg auch nur bis zum 4. Tag an, während die Steigerung des Chlorophyllgehaltes zwischen dem 4. und dem 5. Tag (von 0,36 auf 0,47 mg/l) noch groß war.

Tabelle 5: Veränderung der enzymatischen Aktivität mit dem Alter der Kultur (Azocaseinspaltung = Zunahme der O.D._{440 nm}; PC-Abbau = Abnahme der O.D._{620 nm})

Alter der Kultur	1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage
Naßgewicht g/l	0,73	1,17	1,72	2,00	2,09
Chlorophyll mg/ml	0,08	0,14	0,25	0,36	0,47
Azocaseinspaltung	0,08	0,12	0,22	0,14	0,17
Phycocyaninabbau	0,13	0,18	0,26	0,25	0,34

4.1.5.2 Stabilität der enzymatischen Aktivität in der Pelletsuspension

Zwei Pelletsuspensionen (aus auf L-T-4-C gewachsenen Kulturen) mit guter phycocyaninabbauender Aktivität wurden bei 4 °C bzw. -20 °C aufbewahrt und mehrmals dabei die enzymatische Aktivität gemessen.

Die Mittelwerte der Extinktionsdifferenzen sind in Tabelle 6 für Phycocyaninabbau und Azocaseinspaltung dargestellt.

Die enzymatische Aktivität des Pellets gegenüber Phycocyanin nimmt mit der Zeit langsam ab, sowohl bei 4 °C als auch bei -20 °C, aber man kann trotzdem sagen, daß diese Aktivität ziemlich stabil ist, da nach 18 Tagen noch gute Werte (0,31 bzw. 0,34) zu messen sind.

Die proteolytische Aktivität des Pellets gegenüber Azocasein verminderte sich in den ersten 24 Stunden von 0,42 auf 0,29, aber diese restliche Aktivität blieb auch nach 12 Tage bestehen (0,27).

Gute Aktivitäten wurden auch für Pelletsuspensionen gemessen, die über einen längeren Zeitraum bei -20 °C aufbewahrt worden waren.

Tabelle 6: Stabilität der enzymatischen Aktivität des Pellets
(PC-Abbau = Abnahme der O.D._{620 nm},
Azocaseinspaltung = Zunahme der O.D._{440 nm})

Alter des Pellets	Phycocyaninabbau	Azocaseinspaltung
Nach Aufschluß	0,46	0,42
1 Tag 4 °C	0,42	0,29
2 Tage "	0,42	0,27
3 " "	0,33	0,23
4 " "	0,43	0,28
5 " "	0,47	0,22
8 " "	0,40	0,29
12 " "	0,33	0,27
18 " "	0,31	-
18 Tage -20 °C	0,34	-

4.1.5.3 Hitzestabilität der enzymatischen Aktivität des Pellets

Die Pelletsuspensionen aus zwei auf L-T-4-C gewachsenen Kulturen mit guter enzymatischer Aktivität wurden 30 bzw. 60 min lang bei 90 °C in einem Wasserbad erhitzt und nach dem Abkühlen (Eisbad), auf ihre enzymatische Aktivität untersucht.

Die Mittelwerte der zu den jeweiligen Zeiten gemessenen Aktivitäten sind für Phycocyaninabbau und Azocaseinspaltung in Tabelle 7 wiedergegeben.

Während die phycocyaninabbauende Aktivität deutlich mit der Hitzebehandlung abnimmt, zeigte sich keine Veränderung bei der Azocaseinspaltung. Eine nennenswerte restliche phycocyaninabbauende Aktivität (0,18) läßt sich auch nach 60 min Inkubation bei 90 °C beobachten.

Tabelle 7: Enzymatische Aktivität nach Hitzebehandlung der Pelletsuspension (PC-Abbau = Abnahme der O.D._{620 nm}
Azocaseinspaltung = Zunahme der O.D._{440 nm})

Enzym-Test	nicht erhitzt	30 min 90°C	60 min 90 °C
PC-Abbau	0,40	0,28	0,18
Azocasein- spaltung	0,29	0,28	0,30

Die mit beiden Methoden erzielte unterschiedliche Hitzestabilität deutet darauf hin, daß Azocaseinspaltung und PC-Abbau durch unterschiedliche Enzyme der Pelletsuspension katalysiert werden.

4.1.5.4 Einfluß des pH-Wertes im Enzym-Test auf die proteolytische Aktivität der Pelletsuspension gegenüber Phycocyanin

Getestet wurden pH-Werte von 6 , 7 , 8 und 9 , wobei von einem 0,1 M Tris/HCl Puffer (siehe 3.4.2) mit dem entsprechenden pH-Wert ausgegangen wurde. Für den 0-Wert wurden entsprechende Lösungen nur mit Phycocyanin und Puffer, wie beim Enzym-Test, parallel behandelt.

Der Mittelwert der Ergebnisse von Doppelproben mit zwei unterschiedlichen Pelletsuspensionen ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Einfluß des pH-Wertes im Enzym-Test auf die phycocyaninabbauende Aktivität des Pellets (Abnahme der O.D.₆₂₀ in 60 min)

pH	6	7	8	9
Aktivität minus 0-Wert	0,05	0,09	0,25	0,35
Nullwert	0,03	0,03	0,04	0,13

Die phycocyaninabbauende Aktivität verdoppelt sich mit einer pH-Einheit für pH-Werte zwischen pH 6 und pH 8 während die 0-Werte (Veränderung der E₆₂₀ nm durch den Einfluß vom pH des Puffers auf die dreidimensionale Struktur von Phycocyanin) praktisch unverändert bleiben. Bei pH 9 ist die Aktivität größer, aber auch die Abnahme der O.D.₆₂₀ des Phycocyanins in der Kontrolle wird dabei stark verändert.

4.1.5.5 Einfluß von Ionen im Enzymtest auf die phycocyaninabbauende Aktivität des Pellets

Ionen wie Ca²⁺ und Mg²⁺, in einer Endkonzentration von 5 mM dem Enzym-Test zugegeben, zeigten keinen Einfluß auf die phycocyaninabbauende Aktivität der Pelletsuspension.

4.2 Allgemeines zur Extraktion der membrangebundenen phycocyaninabbauenden Aktivität

Membrangebundene Proteine in Lösung zu bekommen, ist ein schwieriges Problem. Im Laufe dieser Arbeit wurden mehrere Möglichkeiten und Methoden getestet und schließlich die Methode ausgewählt, welche am leistungsfähigsten erschien.

Durch Einfrieren der Synechococcus 6301-Zellen und Nachbehandeln der Pelletsuspension mit Ultraschall ist es gelungen, einen phycocyaninabbauenden Extrakt zu gewinnen.

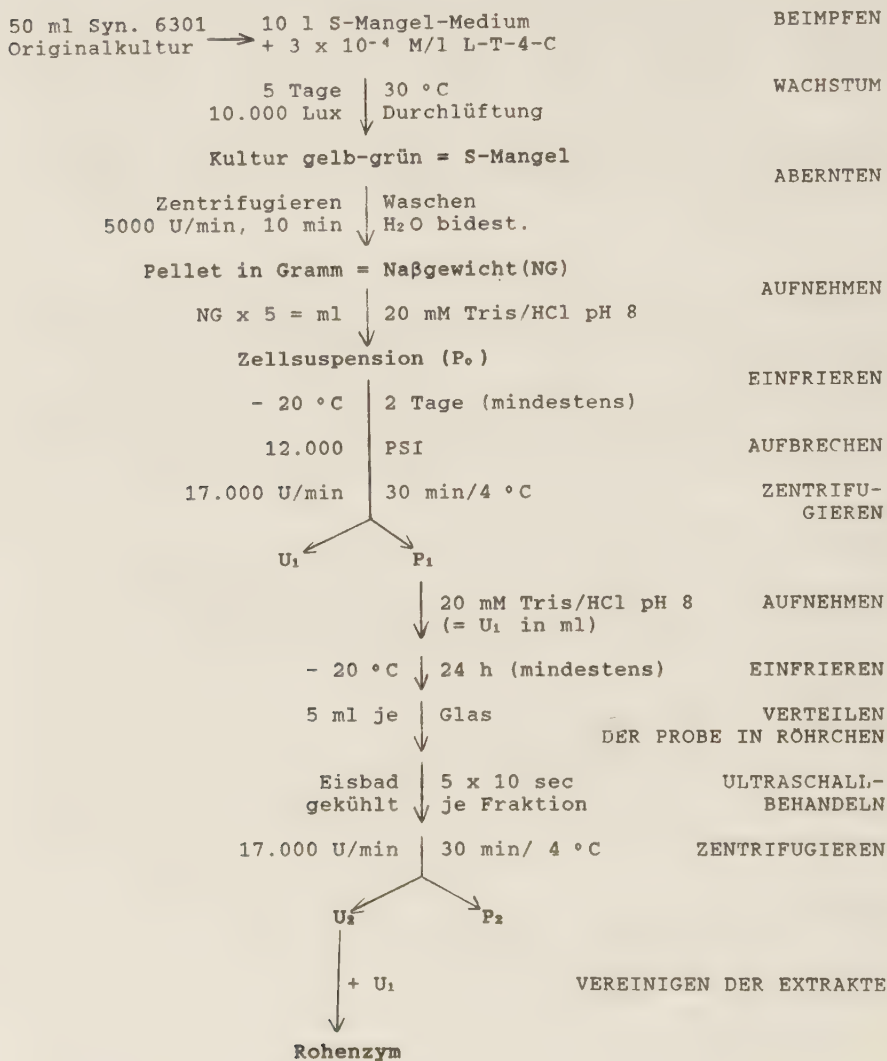
4.2.1 Extraktion der pelletgebundenen Protease(n)

Bei der Extraktion von membrangebundenen Proteinen durch Einfrieren und Ultraschallbehandlung werden mechanische Angriffe an der Zellmembran ausgeübt und dadurch Membranproteine freigesetzt.

Synechococcus 6301 wurde für die Extraktion in 10 Liter S-Mangel-Medium mit 3×10^{-4} M/l L-T-4-C kultiviert und die Zellen durch Zentrifugation abgeerntet. Nach mehreren Testversuchen mit unterschiedlichen Puffern (Aufbrechpuffer; Kaliumphosphatpuffer; Trispuffer), bei verschiedenen Pufferkonzentrationen, wurden die abzentrifugierten Zellen im 5-fachen Volumen des Naßgewichtes (w/v) 20 mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen und für mindestens 48 Stunden bei -20°C eingefroren (Abbildung 6). Nach Auftauen der Zellsuspension wurden die kältegeschädigten Zellen noch bei 12.000 PSI gebrochen und unmittelbar danach 30 min lang bei 17.000 U/min in einer vorgekühlten Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert.

Der Überstand davon wurde unter der Bezeichnung U_1 als erster Enzym-Extrakt aufgesammelt.

Abbildung 6: Schema der Extraktion des membrangebundenen Enzyms durch Einfrieren der heilen Synechococcus 6301-Zellen und Ultraschallbehandlung der Pelletsuspension



Das Pellet wurde in 20 mM Tris/HCl pH 8 (Volumen gleich U_1 in ml) suspendiert und erneut eingefroren (Einfrieren der Pelletsuspension ergab bessere Ergebnisse). Nach mindestens 24 Stunden wurde die Pelletsuspension (P_1) aufgetaut, in 5 ml-Fractionen verteilt (in Glaszentrifugengläser) und jede Fraktion für 5 x 10 Sekunden mittels eines "Micro Tip SONIFIER B-12" (Branson Sonic Power Company) mit Ultraschall behandelt. Die Proben wurden dabei in einem Eisbad gekühlt. Nach Vereinigen der Fraktionen wurden diese wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand hiervon (U_2), mit U_1 vereinigt, entsprach dem Rohenzym.

Untersuchungen nach jeder Stufe der Extraktion zur phycocyaninabbauenden Aktivität (siehe 3.4.2) von Pellet bzw. Überstand ergaben für die Extrakte U_1 (0,27) und U_2 (0,19) relativ gute Aktivitäten, ohne daß die Aktivität des Pellets sich vermindert zeigte (siehe Tabelle 9). Eine weitere Behandlung von P_2 (Einfrieren + Ultraschall) ergab keinen aktiven Extrakt mehr (U_3), obwohl das Pellet (P_3) noch gute Aktivität zeigte. Die in Tabelle 9 angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 15 aufeinander folgenden Extraktionen.

Tabelle 9: Phycocyaninabbauende Aktivität der Pellets sowie der Überstände nach der jeweiligen Extraktion

Stufe der Extraktion	P_1	P_2	P_3	U_1	U_2	U_3
Phycocyaninabbauende Aktivität	0,25	0,26	0,25	0,27	0,19	0,02

Abnahme der O.D.₆₂₀ nm nach der Inkubation (60 min bei 37 °C) von Phycocyanin (Ausgangs-O.D.₆₂₀ nm $\approx$ 1) mit den jeweiligen Proben.

Daß die Aktivität des Pellets durch die Extraktion nur wenig verändert wird, wurde auch bei Extraktionversuchen mit Triton X-100 beobachtet, was dafür spricht, daß die Enzymmoleküle fest verankert und schwer zugänglich in der Membran sitzen und durch

diese Methode(n) nur ein kleiner Teil davon in Lösung gebracht werden kann.

Das Rohenzym ist intensiv grün-gelb gefärbt. Anschließend wurde das Enzym aus diesem Extrakt durch Trennung an einer DEAE-Sephacel-Säule angereichert.

4.2.2 Anreicherung des Rohenzyms durch Trennung an DEAE-Cellulose

Das Rohenzym (bestehend aus der Vereinigung der Extrakte U_1 und U_2) wurde gefriergetrocknet und das trockene Material in 1/10 des Originalvolumens in bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die konzentrierte Probe wurde dann durch Trennung an DEAE-Sephacel gereinigt (Abbildung 7).

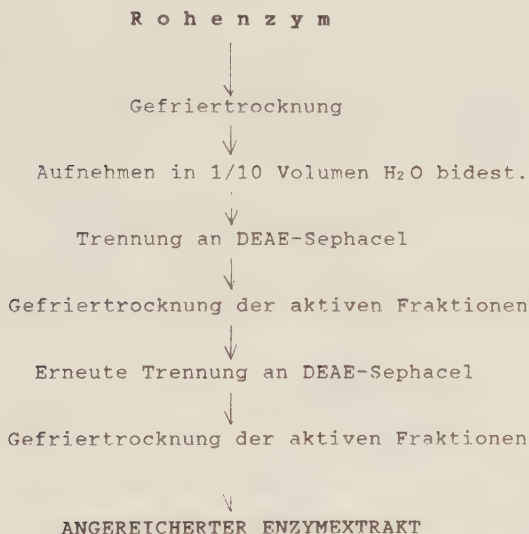
Die Versuchsdurchführung verlief ähnlich, wie in Punkt 3.5.3 von "Material und Methoden" für die Reinigung von Phycocyanin beschrieben.

Nach Packen der Säule mit DEAE-Sephacel-Gel und Spülen mit 20 mM Tris/HCl pH 8 wurde eine Probe des, wie in 4.2.1 beschrieben, erhaltenen Rohenzyms aufgetragen. Mit demselben Puffer wurde das ungebundene Material ausgewaschen und mit einem NaCl-Gradienten (0 - 0,5 M in demselben Puffer) das gebundene Material eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden auf ihre phycocyaninabbauende Aktivität untersucht. Hierzu wurden 0.5 ml der jeweiligen Testfraktionen mit 0,5 ml einer PC-Lösung (in 0,1 M Tris/HCl pH 8) gemischt, so daß eine Ausgangs O.D.₆₂₀ nm von ca. 1 zu messen war. Die Proben wurden für 60 min bei 37 °C inkubiert und erneut die O.D.₆₂₀ nm am Spektralphotometer gemessen. Die Abnahme der O.D.₆₂₀ nm ergab die enzymatische Aktivität der entsprechenden Probe.

Die Hauptaktivität der aufgetragenen Enzymprobe wurde nicht an der Säule gebunden und lief beim Vorspülen durch. An der Gel-Säule blieb dabei sehr viel grüngefärbtes Material hängen, welches zum Teil mit dem NaCl-Gradienten eluiert wurde. Einige

dieser Fraktionen besaßen etwas phycocyaninabbauende Aktivität. Die aktiven Fraktionen des Durchlaufes und des Eluates wurden getrennt aufgesammelt und durch Gefriertrocknen eingeengt. Die Eluatprobe wurde zum Entsalzen vor dem Einengen dialysiert. Die so vorgereinigten und konzentrierten Proben wurden erneut einer DEAE-Sephacel-Trennung unterworfen. Für beide Proben (Durchlauf und Eluat) blieb bei der zweiten DEAE-Sephacel-Trennung die phycocyaninabbauende Aktivität in dem Durchlauf.

Abbildung 7: Anreicherung des Rohenzym durch Trennung an DEAE-Sephacel



Daß bei der ersten DEAE-Cellulose-Reinigung des Rohenzym ein Teil der proteolytischen Aktivität erst mit dem NaCl-Gradienten eluiert wird, spricht dafür, daß das Enzym zum Teil an andere Bestandteile des Extraktes gekoppelt ist, welche vom Gel gebunden werden. Der NaCl-Gradient löst diese Bindungen auf, so daß bei

der zweiten DEAE-Cellulose-Trennung das Enzym im Durchlauf gefunden wird.

Nach dem Vereinigen der aktiven Fraktionen wurde die Sammelprobe durch Gefriertrocknen konzentriert und als "Angereicherter Enzymextrakt" für weitere Untersuchungen verwendet.

4.2.3 Eigenschaften des angereicherten Enzymextraktes

4.2.3.1 Kinetik des Abbaues von Phycocyanin durch den angereicherten Enzymextrakt

Die Kinetik der Reaktion wurde für zwei unterschiedliche Enzymmengen (200 bzw. 400 $\mu\text{l/ml}$) im Test untersucht (3.4.2), indem die O.D._{620 nm} in bestimmten Zeitabständen gemessen wurde. Die erhaltenen Werte sind in Abbildung 8 in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Auch am Phycocyaninspektrum ließ sich eine entsprechende Veränderung während des Abbaus durch das Enzym verfolgen. Die erhaltenen Bilder sind überlagert in Abbildung 9 wiedergegeben.

Wie schon für den Abbau von Phycocyanin durch die Pelletsuspension (Abb. 4) beobachtet, verläuft mit diesem Enzymextrakt die Reaktion zu Beginn schneller und verlangsamt sich mit der Zeit. Aus Abbildung 8 läßt sich erkennen, daß die Geschwindigkeit des Phycocyaninabbaues proportional zur Enzymmenge im Test ist, zumindest unter den in diesem Test verwendeten Konzentrationen.

Abbildung 8: Kinetik des Abbaues von Phycocyanin durch den angereicherten Enzymextrakt

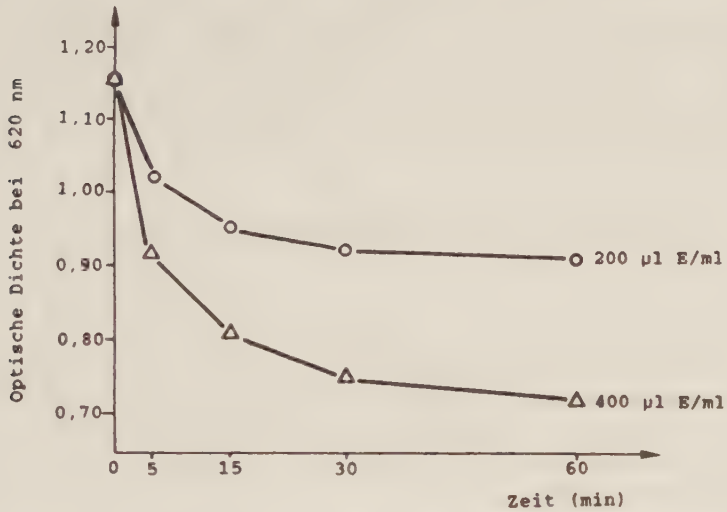
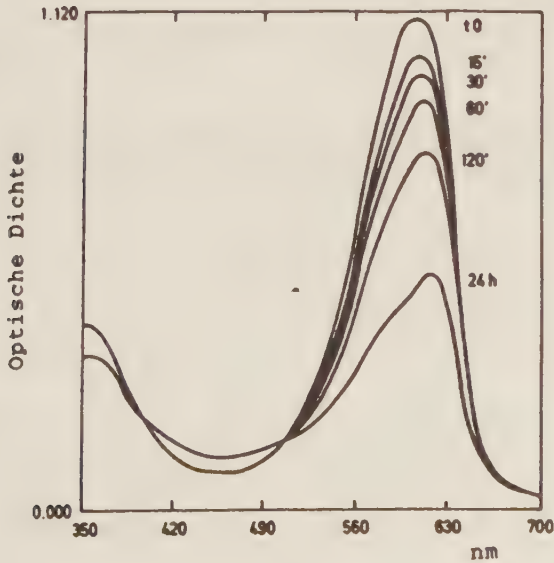


Abbildung 9: Veränderung des Phycocyanin-Spektrums während des Abbaues durch den Enzymextrakt



4.2.3.2 Stabilität des angereicherten Enzymextraktes

Der Enzymextrakt ließ sich über längere Zeit (Monate) bei - 20 °C lagern, ohne daß große Aktivitätsverluste festgestellt werden konnten. Für kurze Zeit (1-3 Tage) ließ sich der Enzymextrakt problemlos auch bei 4 °C aufbewahren.

4.2.3.3 Hitzestabilität des angereicherten Enzymextraktes

Enzymextrakt-Proben, wie für den Enzym-Test vorbereitet (Enzym + 0,1 M Tris/HCl pH 8), aber ohne Phycocyanin wurden bei 90 °C für 5 min, 15 min und 30 min erhitzt. Nach Abkühlen der Proben in einem Eisbad wurden diese mit Phycocyanin bis zu einer O.D.₆₂₀ von ca. 1 versetzt, 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert und die O.D.₆₂₀-Abnahme verfolgt. In Tabelle 10 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt.

Die phycocyaninabbauende Aktivität des Enzyms wird nach 15 min bei 90 °C auf ca. die Hälfte reduziert. Die verbleibende Aktivität wird auch durch eine Verlängerung der Hitzebehandlung auf 30 min nicht beeinflußt.

Hierzu übereinstimmende Ergebnisse waren schon für die Pelletsuspension (Tab. 7) beobachtet worden.

Tabelle 10: Hitzestabilität des Enzymextraktes; Abbau von Phycocyanin (Abnahme der O.D.₆₂₀ nm) durch unterschiedlich lang hitzebehandelte Enzymextrakt-Proben

Inkubationszeit bei 90 °C	nicht erhitzt	5 min	15 min	30 min
PC-abbauende Aktivität	0,27	0,18	0,16	0,16
	0,22	-	0,14	-
	0,32	-	-	0,18

4.2.3.4 Einfluß des pH-Wertes im Enzym-Test auf die proteolytische Aktivität des Enzymextraktes gegenüber Phycocyanin

Für diesen Versuch wurde bei der Vorbereitung der Enzym-Test-Proben (Enzym + Phycocyanin + Puffer) von 0,1 M Tris/HCl mit unterschiedlichen pH-Werten (wie in Tabelle 11) ausgegangen. Die so vorbereiteten Proben mit einer Ausgangs-O.D.₆₂₀ von etwa 1 wurden für 60 min bei 37 °C inkubiert und dabei die Veränderung der Optischen Dichte verfolgt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 11 dargestellt.

Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit Daten, die durch die Pelletsuspension erzielt wurden. Die Aktivität verdoppelt sich mit einer pH-Einheit bis pH 8, ohne daß die O.D.₆₂₀ des eingesetzten Phycocyanins (dreidimensionale Strukturveränderung) verändert wird. Das Optimum liegt hier bei pH 8,5.

Tabelle 11: Einfluß des pH-Wertes im Enzymtest auf den Abbau von Phycocyanin durch den Enzymextrakt

pH im Enzymtest	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10
Aktivität minus 0-Wert	0,08	0,13	0,17	0,23	0,37	0,50	0,45	0,40	0,19
Nullwert	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,09	0,12	0,27

4.2.3.5 Einfluß von Ionen im Enzym-Test auf die phycocyanin-abbauende Aktivität des angereicherten Enzymextraktes

Substanzen wie KCl, NaCl, CaCl₂, MnCl₂, MgCl₂, dem Enzym-Test in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben, zeigten keinen Einfluß auf den Abbau von Phycocyanin durch das Enzym. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit denen für die Pelletsuspension (4.1.5.5).

4.2.3.6 Aktivität des angereicherten Enzymextraktes gegenüber Phycobiliproteinen anderer Organismen

Das angereicherte Enzym wurde auf proteolytische Aktivität gegenüber Phycobiliproteinen aus anderen Organismen untersucht. Hierzu wurde der Enzym-Extrakt mit den Biliproteinen aus unterschiedlichen Organismen bei einer Ausgangs-Optischen-Dichte von 1, für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und die Abnahme bei der entsprechenden Wellenlänge bestimmt. In Tabelle 12 sind die untersuchten Phycobiliproteine, die Organismen aus denen sie stammen und die Ergebnisse des Abbaues durch das Enzym dargestellt.

Tabelle 12: Aktivität des angereicherten Enzymextraktes gegenüber Phycobiliproteinen aus anderen Organismen

PBP	Organismus	OD Abnahme/60 min	nm
PC	<u>Synechococcus 6301</u>	0,29	620
PC	<u>Synechococcus 6301</u> (*)	0,25	620
APC	<u>Synechococcus 6301</u> (*)	0,21	651
PC	<u>Polypothrix</u> (*)	0,48	620
APC	<u>Polypothrix</u> (*)	0,36	651
PC	<u>Spirulina platensis</u>	0,20	620
PE	<u>Pseudoanabaena</u>	0,17	560
PC	<u>Mastigocladus laminosus</u>	0,05	620
Abbau von Azocasein		0,36	440

In den mit (*) markierten Fällen wurden nur teilweise gereinigte Phycobiliproteine verwendet.

Es wurde dabei festgestellt, daß der Enzym-Extrakt auch Phycobiliproteine aus anderen Organismen abbauen kann. Die nach einer Stunde gemessenen Werte sind jedoch unterschiedlich.

Während sich gegen Phycocyanin aus M. laminosus (ein thermophiler Organismus) sehr geringe Aktivität zeigte (0,05), wurde sowohl Phycocyanin (0,48) als auch Allophycocyanin (0,36) aus Polypo-thrix stärker abgebaut als das eigene Phycocyanin (Abbau von PC aus Synechococcus 6301 = 0,29). Die Werte des Abbaues von Phycocyanin aus S. platensis (0,20) und Phycoerythrin aus Pseudoanabaena (0,17) lagen etwas unter denen der Kontrolle (PC aus Synechococcus 6301 = 0,29).

Azocasein, ein für Endopeptidasenuntersuchungen verwendetes Substrat (4.1.3.1), wird auch durch den Enzymextrakt abgebaut.

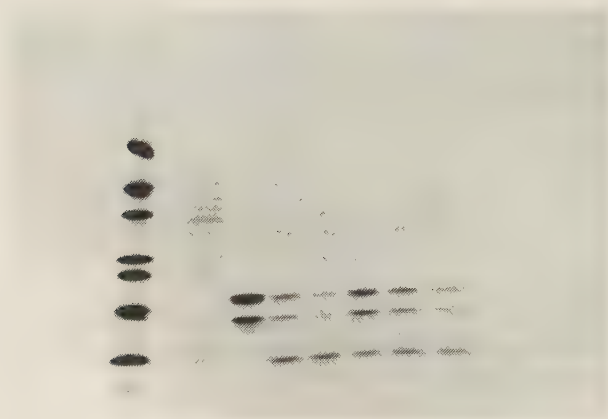
4.2.3.7 SDS-PAGE von angereichertem Enzymextrakt sowie von intaktem Phycocyanin und Phycocyanin nach proteolytischem Abbau

Die SDS-PAGE wurde wie in Punkt 3.6.1 beschrieben durchgeführt. Ein Bild der getrennten Coomassie-Blue-angefärbten Proteine ist in Abbildung 10 dargestellt.

Für die Enzymtestproben wurde eine Phycocyanin-Lösung (in 0,1 M Tris/HCl pH 8) mit einer Ausgangs O.D._{620 nm} von ca. 1 mit den bei Abbildung 10 angegebenen Mengen an Enzymextrakt für 24 h (Bahnen 4-5) bzw. 90 min (Bahnen 6-8) bei 37 °C inkubiert.

Für die Elektrophorese wurden je 100 µl der Probe mit 20 µl 5-fach-konzentriertem Laemmli-Puffer vermischt, für 2 min bei 100 °C denaturiert und davon je 20 µl auf das entsprechende Fenster des Gels aufgetragen (3.6.1).

Abbildung 10: Gelbild nach SDS-PAGE-Trennung von gereinigtem Enzymextrakt, intaktem Phycocyanin und Phycocyanin nach der Inkubation (24 h bzw. 90 min) mit unterschiedlichen Mengen an Enzymextrakt.



Von links nach rechts ist in den Bahnen des Gelbildes zu sehen:

- 1 - Eichproteine
- 2 - Enzymextrakt (nach Punkt 4.2.2 angereichert)
- 3 - Hochgereinigtes Phycocyanin (3.5)

Enzymtestproben:

- | | | | |
|----------------------------|------------|-----------|-----------|
| 4 - PC + Enzym (100 µl/ml) | 24 Stunden | bei 37 °C | inkubiert |
| 5 - PC + Enzym (200 ") | " " | " " | " " |
| 6 - PC + Enzym (100 µl/ml) | 90 min | bei 37 °C | inkubiert |
| 7 - PC + Enzym (200 ") | " " | " " | " " |
| 8 - PC + Enzym (300 ") | " " | " " | " " |

E n z y m

Für den Enzymextrakt treten nach der Elektrophorese mehrere Banden auf (Bahn 2), was dafür spricht, daß das Enzym noch nicht vollständig gereinigt ist. Der Vergleich von diesem Bild (Bahn 2) mit denen aus den daneben stehenden Enzymtestproben (Bahnen 4-8) sowie aus anderen Elektrophoresen (Abbildung 23) legt die Vermutung nahe, daß die Bande direkt unter der Linie des 36.000-Dalton-Eichproteinmarkers das gesuchte Enzym sein könnte. Diese Bande tritt immer auf, wenn das Enzym in der Probe vorhanden ist.

Phycocyaninabbau durch das Enzym

Der enzymatische Abbau von Phycocyanin durch den Enzymextrakt wird durch die Bilder dieser elektrophoretischen Trennung bewiesen. Während für Phycocyanin nur die α - und β -Banden auftreten, läßt sich für die Enzymtestproben eine neue Bande beobachten, welche unterhalb des 14.200 Da.-Eichproteinmarkers zu sehen ist. Die Zunahme dieser Bande sowie die Abnahme der α - und β -Banden ist sowohl von der Enzymmenge im Test (Bahnen 4-5 bzw. 6-7-8) als auch von der Inkubationszeit (Vergleich Bahnen 6-7, Inkubationszeit 90 min, mit 4-5, Inkubationszeit 24 h) abhängig.

Die densitometrische Vermessung der Bahnen (Vitatron TLD 100 Densitometer) ergibt für jede Bahn ein Spektrum, in dem das Verhältnis der Peakgrößen die Proteinmengenverhältnisse ausdrückt. Die Berechnung des Flächeninhaltes der dabei entstehenden Peaks durch numerische Integration nach der SIMPSON-Regel (BARTSCH, 1975):

$$\int_a^b y \, dx = \frac{b-a}{3n} (y_a + 4y_1 + 2y_2 + 4y_3 + 2y_4 + \dots + 4y_{n-1} + y_b)$$

n = Anzahl der gleichen Teile des Intervalls = $2k$; k N

a = Erster x-Wert

b = Letzter x-Wert

y = Höhe der Kurve in gleichen x-Abständen

erlaubte eine numerische Darstellung der Veränderungen der Protein-Mengenverhältnisse in einer Probe.

In Tabelle 13 sind die berechneten Werte dargestellt:

Teil a: berechnete Werte für die jeweiligen Peaks in einem Spektrum

" b: Werte von Teil a prozentual zu PC ($\alpha + \beta = 100 \%$) dargestellt

" c: zeigt die Abnahme der α - bzw. β -Banden sowie die Zunahme der entsprechenden Abbaubanden in einer Probe

Insgesamt gesehen läßt sich feststellen, daß die Abnahme der α - und β -Banden in einer Probe größer ist als die Zunahme der Abbaubanden, was für einen weiteren Abbau der Abbauprodukte in dieser Bande spricht. Ein weiterer PC-Abbau durch mehr Enzym oder Verlängerung der Inkubationszeit gibt nur geringe Zunahme der Abbaubanden.

Kürzere Zeiten und mehr Enzym (schneller Abbau = 90 min) ergeben größere Abbaubanden als weniger Enzym und längere Inkubationszeiten, auch wenn dabei die Verminderung der α - und β -Banden deutlich größer ist.

Tabelle 13: Numerische Darstellung des Abbaus von Phycocyanin durch das Enzym sowie des dabei entstehenden Abbaupeptids

Spektren	PC	90 min Ink.Z.			24 h Ink.Z.	
		0,1 ml E	0,2 ml E	0,3 ml E	0,1 ml E	0,2 ml E
Teil a: berechnete Werte für die jeweiligen Peaks in einem Spektrum						
β	27,8	13,15	9,92	5,26	7,53	3,60
α	19,9	11,40	6,97	4,62	6,12	2,60
Peak	-	9,0	11,92	12,70	11,45	12,51
Σ	47,6	33,55	28,81	22,58	25,10	18,71
% v. Σ	100%	70,48%	61 %	47 %	53 %	39 %
Teil b: Prozentuale Verteilung des Ausgangs-PC ($\alpha + \beta = 100 \%$)						
% β	58	28	21	11	16	8
% α	42	23	15	10	13	6
% Peak	-	19	25	27	24	26
Teil c: Verluste von α und β sowie Zunahme des Abbaupeaks in % -Werten						
β	-	30	37	47	42	50
α	-	18	26	31	28	35
$\alpha + \beta$	-	48	63	78	70	85
Peak	-	18	24	26	24	26

4.3 Veränderung von Phycocyanin durch den Enzymextrakt und Suche nach den PC-Bruchstücken

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die proteolytische Aktivität von Membranfraktionen bzw. der aus der Membranfraktion gewonnenen Extrakte gegenüber Phycocyanin untersucht. Dieses wurde anhand der Abnahme der optischen Dichte bei 620 nm (PC-Absorptionsmaximum) dargestellt.

In diesem Abschnitt sollen die dadurch entstehenden Veränderungen des Phycocyanins untersucht werden.

Für diese Untersuchungen wurde nur hochgereinigtes Phycocyanin aus *Synechococcus* 6301 (3.5) und angereicherter Enzymextrakt (4.2) verwendet.

4.3.1 SDS-PAGE von Enzymtest-Proben in einem Molekulargewichtsbereich von 14.200 - 66.000 Dalton

Die Versuchsdurchführung der Elektrophorese ist in "Material und Methoden" unter Punkt 3.6.1 beschrieben.

Durch eine Reihe von Vorversuchen konnte festgestellt werden, daß nach der Inkubation von Phycocyanin mit dem Enzymextrakt PC-Abbauprodukte entstehen, welche nach SDS-PAGE auf dem Gel, von den β - und α -Banden getrennt, unterhalb des kleinsten MG-Markers von 14.200 Dalton (4.2.3.7) auftreten.

Um detailliertere Informationen über den Abbauprozess zu erlangen, wurde eine Enzymtest-Probe wie folgt vorbereitet:

- 2,6 ml Enzymextrakt
- 1,3 ml Phycocyanin
- 3,1 ml 0.1 M Tris/HCl pH 8
- 7,0 ml Gesamtvolumen

Diese Probe wurde bei 37 °C inkubiert und zu den Zeiten $t = 0$, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min und 2 h, Aliquots von je 1

ml entnommen. Von jeder Probe wurde unmittelbar nach der Entnahme ein Spektrum zwischen 350 - 700 nm am Spektralphotometer aufgenommen und die Probe dann sofort eingefroren.

Die zu der jeweiligen Zeit gemessenen Spektren sind überlagert in Abbildung 11 dargestellt.

Aus diesen Bildern läßt sich die Abnahme der optischen Dichte bei 620 nm (Absorptions-Maximum von PC) verfolgen; diese ist in Abbildung 12 gegen die Zeit dargestellt. Mit einer O.D.₆₂₀-Abnahme von 0,32 nach 2 Stunden verlief die Reaktion wie erwartet.

Abbildung 11: Überlagerte Spektren für die jeweilige Inkubationszeit

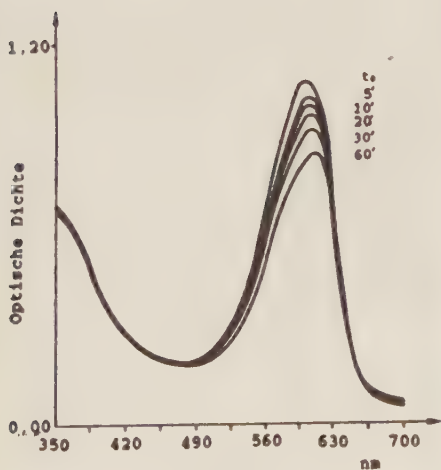
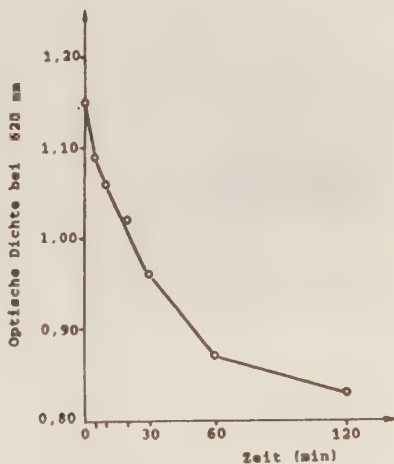


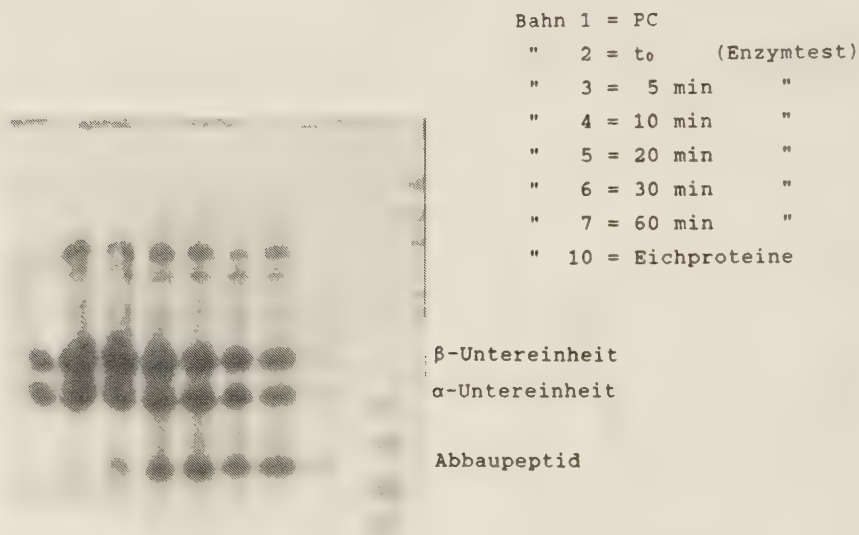
Abbildung 12: Zeitkinetik des Phycocyaninabbaus



Die eingefrorenen Proben wurden 2 Stunden lang lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden mit je 120 μ l Auftragspuffer versetzt und wie unter 3.6.1 beschrieben einer SDS-PAGE-Trennung unterworfen. Eine Probe intaktes Phycocyanin ist als Kontrolle mitgelaufen.

Nach Färben und Entfärben des Gels ergab sich ein Bild wie unter Abbildung 13 dargestellt.

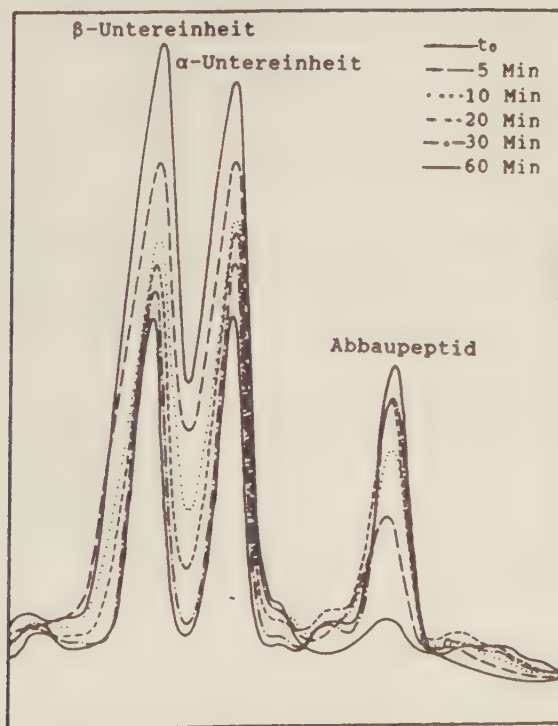
Abbildung 13: Fotografiertes Gel nach elektrophoretischer Trennung von Enzymtest-Proben in Zeitkinetik



Während für Phycocyanin nur die β - und α -Banden auftreten, läßt sich für die Enzymtest-Proben immer eine Abbaubande beobachten, deren Intensität von der Inkubationszeit abhängig ist. Diese Abbaubande muß ein chromophorhaltiges Peptid enthalten, da sie vor dem Anfärben der Gele auch sichtbar ist.

Nach densitometrischem Scannen der im Gel aufgetrennten Proben (Vitatron TLD 100 Densitometer) und Überlagerung der erhaltenen Spektren (Abbildung 14), kann eine deutliche Abnahme der Proteinmenge in den β - (20.000 Da.) und α - (16.000 Da.) Banden, sowie eine Zunahme der Proteinmenge für die Bande im kleineren MG-Bereich in Abhängigkeit von der Inkubationszeit beobachtet werden.

Abbildung 14: Densitometrische Spektren der SDS-PAGE-getrennten Enzymtest-Proben, überlagert dargestellt



Durch numerische Integration der Peaks in Abbildung 14 nach der SIMPSON-Regel (siehe 4.2.3.7; BARTSCH, 1975) wurden die Protein-Mengenverhältnisse in einer Probe ermittelt.

Die Ergebnisse ergaben aber keine direkte Relation zwischen der Proteinabnahme der β - und α -Ketten und der Proteinzunahme des Abbaupeptids.

Die Peptide kleinerer Molekulargewichte reichern sich an, aber der Abbau der β - und α -Ketten ist größer als die Anreicherung dieses Peptids, was dafür spricht, daß dieses Peptid nur ein Zwischenprodukt ist und weiter abgebaut wird.

4.3.2 Suche nach kleineren Phycocyaninabbauprodukten durch Veränderung der Elektrophorese-Bedingungen

Die, wie im Punkt 4.3.1 beschrieben, erhaltene Phycocyaninabbau-bande liegt unterhalb des kleinsten verwendeten MG-Markers von 14.200 Da. und somit auch außerhalb des linearen Bereichs der Eichgeraden (Abb. 17(1)).

Um diesen Bereich kleinerer Peptide zu erfassen, wurde eine gezielte SDS-Gelelektrophorese-Trennung durchgeführt. Die Versuchsdurchführung ist in "Material und Methoden" (3.6.2) genauer beschrieben.

Es handelt sich dabei um ein 12,5 %iges, harnstoffhaltiges Gel zur Trennung von Peptiden mit einem MG zwischen 2.510 - 16.950 Dalton.

Aliquots (20 μ l) der gleichen Proben, die für die Elektrophorese-Trennung in Punkt 4.5.1 vorbereitet worden waren, wurden auf ein solches Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

Das angefärbte Gel (Abbildung 15) zeigt eine erste, stärkere Bande, welche die β - und α -Ketten des Phycocyanins enthält und mit Zunahme der Inkubationszeit abnimmt, sowie eine Hauptabbau-bande und mehrere schwächere Banden, die erst nach einer bestimmten Inkubationszeit auftreten.

Die Peptidtrennung der einzelnen Proben wurde mit einem Densitometer abgetastet und die Spektren (Enzymtest-Zeitkinetik) überlagert. Abbildung 16, gibt einen Gesamt-Überblick über die Veränderung der Abbauprodukte. In Abbildung 16, sind die Spektren der schwächeren Banden vergrößert dargestellt.

Abbildung 15: Fotografie des Gels nach der SDS-Gelelektrophorese-Trennung von PC-Abbauprodukten

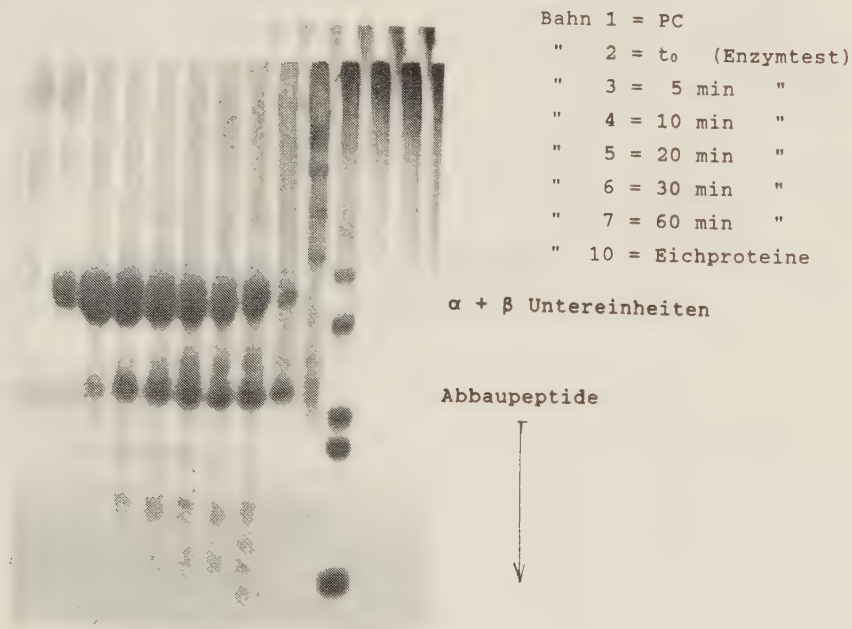
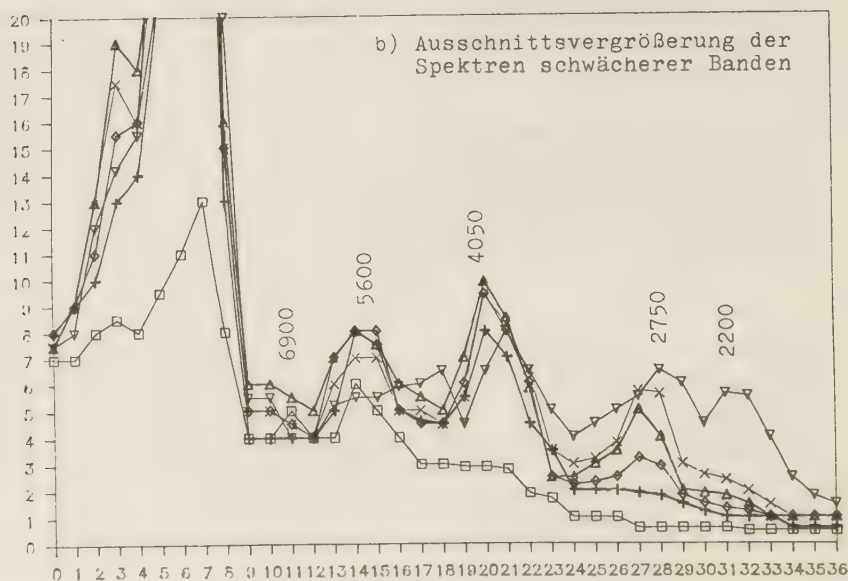
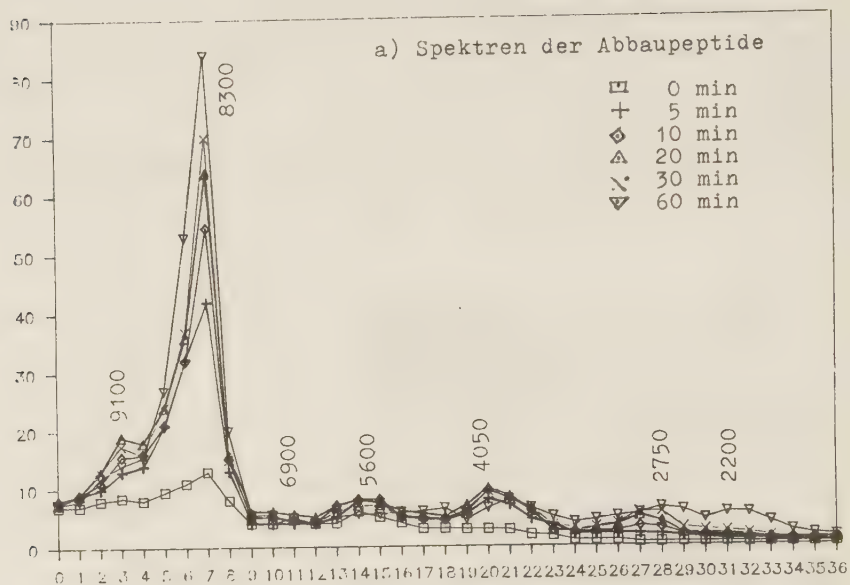
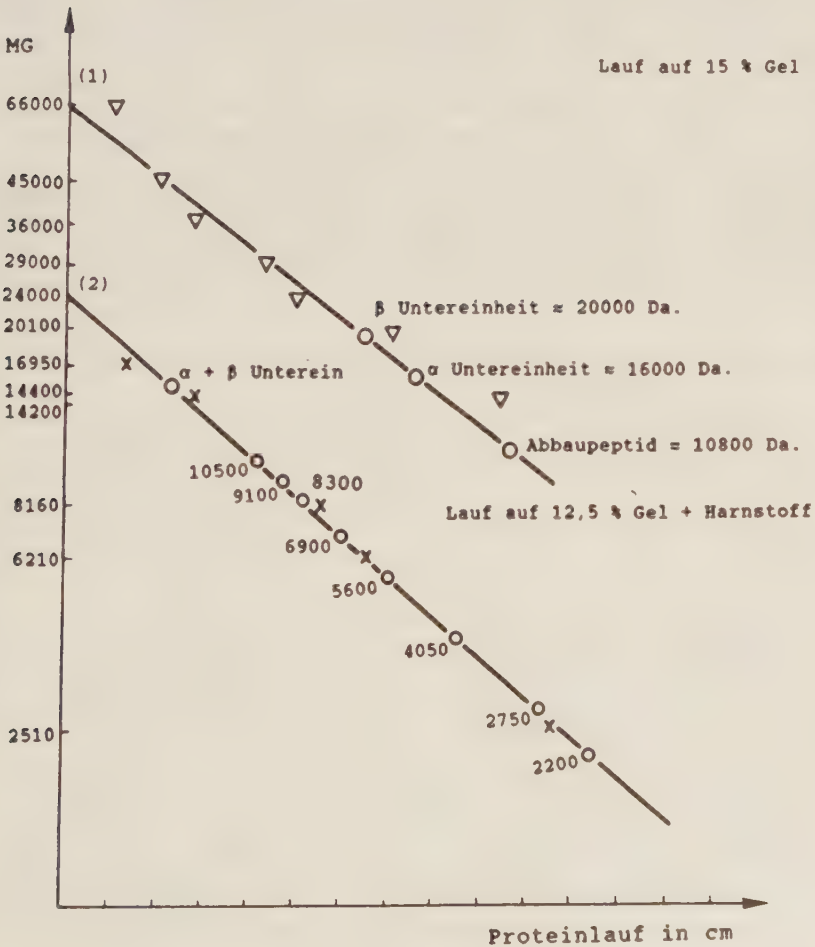


Abbildung 16: Veränderung der Abbauprodukte mit Verlängerung der Inkubationszeit



Mit Hilfe der Eichproteine wurde eine Eichgerade bestimmt (dekadischer Logarithmus des Molekulargewichts der Eichproteine gegen die jeweilige Laufstrecke) und aus dieser entsprechend der Laufstrecke das Molekulargewicht der Abbaubanden abgelesen (Abbildung 17).

Abbildung 17: Eichgerade zur Ermittlung des Molekulargewichts der Phycocyaninabbau-Peptide
 (1) Eichgerade MG 14.200 - 66.000 Dalton
 (2) Eichgerade MG 2.500 - 16.950 Dalton



Bei der Zeit t_0 (Messung direkt nach dem Mischen der Lösungen) ist die Bande bei 8.300 Da. nur andeutungsweise zu sehen (Abb. 15 bzw. 16a). Mit Steigerung der Inkubationszeit wird diese Bande wesentlich größer als die restlichen Abbaubanden; sie wird deshalb als Hauptabbaubande bezeichnet.

Nach 5 min hat die Hauptabbaubande kräftig zugenommen und in Abbildung 16b lassen sich deutliche Peaks bei 5.600 Da. bzw 4.050 Da. erkennen.

Nach 10 min tritt ein neuer Peak auf (2.750 Da.), welcher neben dem Hauptpeak und dem Peak bei 4.050 Da. mit fortlaufender Zeit (20 und 30 min) zunimmt. Der Peak mit 5.600 Da. und die Peaks links (9100 Da.) und rechts (6.900 Da.) vom Hauptpeak bleiben dabei unverändert.

Nach 60 min tritt ein neuer Peak bei MG 2.200 Da. auf; der Hauptpeak und der bei 2.750 Da. nehmen weiter zu, während die Peaks bei 5.600 Da. und 4.050 Da. kleiner werden.

In Tabelle 14 sind die Proteinmengenverhältnisse für die bezüglich der Inkubationszeit unterschiedlichen Proben dargestellt. Dabei werden die schon diskutierten Ergebnisse verifiziert.

Tabelle 14: Proteinmengenverhältnisse in einer Probe für die unterschiedlich lang inkubierten Proben

Peptide Ink. Zeit	PC $\alpha + \beta$	Da. 9100	Da. 8300	Da. 6900	Da. 5600	Da. 4050	Da. 2750	Da. 2200
t_0	392	-	15,8	7,6	7,7	-	-	-
5 min	384	14,3	39,7	7,7	14,8	14,3	-	-
10 min	330	16,7	45,7	8,7	17,7	17,0	-	-
20 min	304	19,0	69,7	9,0	14,7	17,8	5,7	-
30 min	233	17,3	78,5	8,5	11,8	16,7	5,7	-
60 min	203	17,0	93,3	9,4	7,7	14,2	12,5	11,8

Bei dem unter den beschriebenen Bedingungen durchgeführten Enzym-Test-Versuch läßt sich an den Proteinmengenverhältnissen erkennen, daß nach einer Inkubationszeit von 60 min ca. 50 % des PC abgebaut wurde. Etwa die Hälfte davon (25 %) wird in dem 8300 Da.-Peptid (Hauptabbaupeptid) wiedergefunden, während die restlichen identifizierten Peptide nur 18 % des insgesamt abgebauten Phycocyanins ausmachen. Die fehlenden 8 % könnten noch kleinere Peptide sein, welche nicht im Gel erfaßt werden.

Während das Hauptabbaupeptid (8300 Da.) in dieser Inkubationszeit von 60 min sich ständig akkumuliert, werden andere Peptide (9100; 6900; 5600 und 4050 Da.) schon nach 30 min weniger. Andere hingegen entstehen erst zu diesem Zeitpunkt (2750 Da.) oder später (2200 Da.).

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Phycocyanin durch den Enzymextrakt abgebaut wird. Dieser Abbau ergibt ein Hauptabbaupeptid (8.300 Da.) und andere Peptide in geringeren Konzentrationen. In weiteren Stadien des Abbaus - bei ausreichend vorhandenem Enzymextrakt - könnten auch alle diese Peptide abgebaut werden.

4.3.3 Untersuchungen zur Bestimmung von Chromopeptiden nach dem Abbau von Phycocyanin durch den Enzymextrakt

Bei diesen Untersuchungen wurde nach der von KÖST (1978) angewandten Technik gearbeitet.

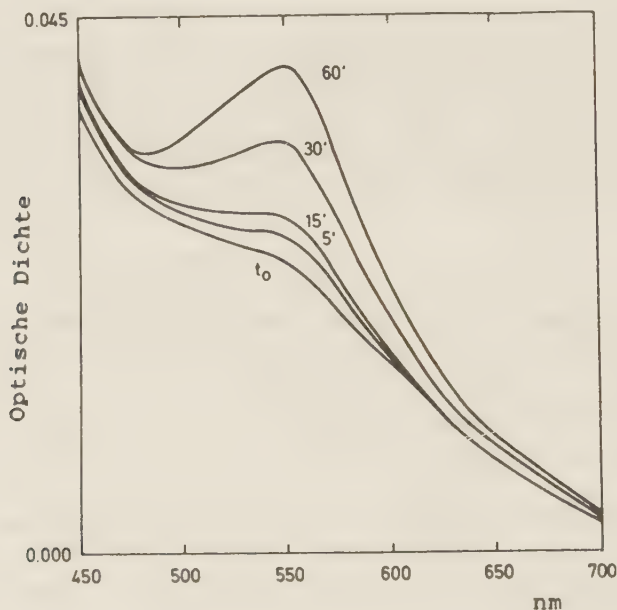
Für den Phycocyaninabbau wurden Enzymtestproben mit hochgereinigtem Phycocyanin und gereinigtem Enzymextrakt so vorbereitet, daß bei einer Ausgangs-O.D.₆₂₀ von ca. 1 nach 60 min Inkubation bei 37 °C die Abnahme der O.D.₆₂₀ etwa 0,3 betrug.

Durch Ansäuern der inkubierten Proben mit Trichloressigsäure bzw. mit HCl wurde das restliche Phycocyanin in der Probe ausgefällt, so daß nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge lila gefärbte Produkte in Lösung blieben, welche am Spektralphotometer einen Peak mit dem Maximum bei ca. 550 nm zeigten.

In Abbildung 18 läßt sich eine Steigerung des Peaks bei 550 nm in Abhängigkeit von der Inkubationszeit deutlich verfolgen, was für die parallele Entstehung von Chromopeptiden spricht.

Für diese Versuche wurden einer Enzymtestprobe während der Inkubationszeit bei den Zeiten: t_0 ; 5 min; 15 min; 30 min; 60 min Aliquots entnommen, diese mit Trichloressigsäure gefällt, in der Tischzentrifuge zentrifugiert und von den Überständen Spektren aufgenommen.

Abbildung 18: Entstehung von Chromopeptiden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit des Phycocyanins mit dem Enzymextrakt



Diese lilagefärbten Überstände wurden noch mit Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Die gefärbten Chromopeptide blieben dabei in der wässrigen Phase und das Chloroform blieb weiterhin klar.

Der Chromophor der Biliproteine kann von Peptiden mit polaren bzw. unpolaren Aminosäuren umgeben sein, wobei die Kettenlänge unterschiedlich sein kann (Köst-Reyes 1978). Durch Ausschütteln mit Amylalkohol können diese zwei Gruppen von Chromopeptiden voneinander getrennt werden:

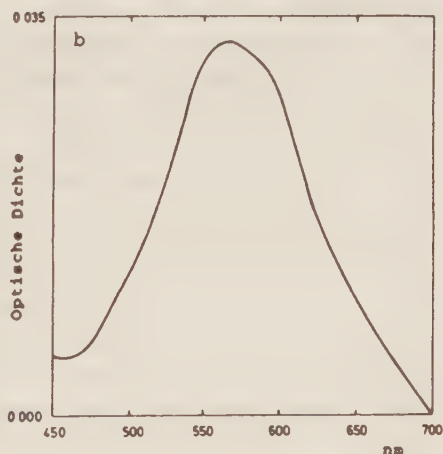
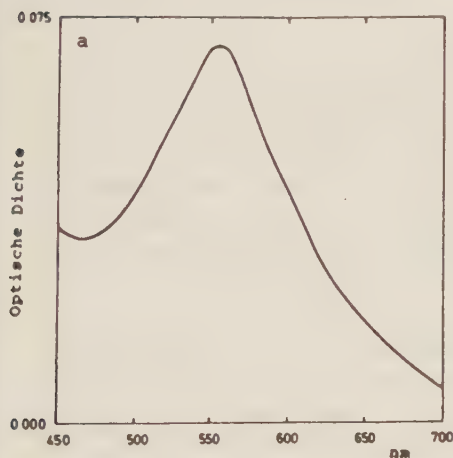
- wässrige Phase = größere Peptide mit polaren Aminosäuren
- Amylalkohol-Phase = kleinere Peptide mit unpolaren Aminosäuren

Durch Mischen der Amylalkohol-Phase mit Petroleumbenzin und Wasser, lassen sich die in dieser Phase enthaltenen Chromopeptide nochmals in die wässrige Phase bringen.

Die Abbildungen 19 a (wässrige-Phase) und b (Amylalkohol-Phase) enthalten die Spektren der getrennten Chromopeptide.

Abbildung 19: Spektren nach Ausschütteln der chromopeptidhaltigen Enzymtestprobe mit Amylalkohol.

- a) Wässrige-Phase
b) Amylalkohol-Phase



67 % der Chromopeptide wurden in der wässrigen Phase gefunden und nur 33 % in der Amylalkohol-Phase. Das heißt, daß 67 % der Chromopeptide von größeren, polaren Aminosäuren umgeben sind und die restlichen 33 % eben von kleineren Peptiden mit unpolaren Aminosäuren. Dieses spricht für einen kontinuierlichen PC-Abbau durch das Enzym, wobei bis zu dem hier untersuchten Punkt die Reaktion noch nicht sehr fortgeschritten ist, so daß die Chromophore noch an relativ lange Peptide gekoppelt sind.

4.3.4 Identifizierung der Schnittstelle des Peptides mit dem Molekulargewicht von 8.300 Dalton

Diese Versuche wurden im Max-Planck-Institut für Biochemie (Genzentrum, Martinsried) unter der Leitung von Dr. Lottspeich durchgeführt (ECKERSKORN et al., 1988). Die Versuchsdurchführung ist in "Material und Methoden" (3.6.3) beschrieben.

Für diese Untersuchungen wurde eine Enzymtest-Probe wie folgt vorbereitet:

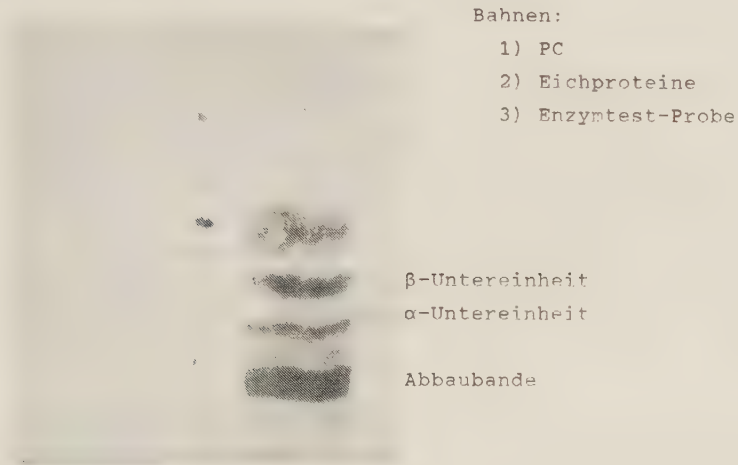
- 1,5 ml gereinigter Enzymextrakt
- 0,6 ml hochgereinigtes Phycocyanin
- 1,9 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8 /Total 4,0 ml

Diese Probe, mit einer Ausgangs O.D.₆₂₀ = 1,02, wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und danach eine O.D.₆₂₀ = 0,73 gemessen. Aus diesen Werten wurde eine O.D.₆₂₀-Abnahme von 0,29 ermittelt, welche der Erwartung bei diesem Enzymtest entsprach.

3 ml dieser Probe wurden eingefroren und auf etwa 100 µl lyophilisiert. Die so konzentrierte Probe wurde mit 100 µl H₂O bidest. verdünnt und wie in Punkt 3.6.3 beschrieben der Trennung an einem 15 %igen SDS-Gel unterworfen. Parallel dazu wurde am selben Gel neben den Eichproteinen auch eine Probe intaktes Phycocyanin als Kontrolle aufgetragen.

Nach Electroblothing der elektrophoretisch getrennten Peptide auf einer silikonisierten Glasfaserplatte und Färbung der Proteine zeigte sich eine Trennung wie in Abbildung 20 dargestellt.

Abbildung 20: Bild der elektrophoretischen Trennung auf einer silikonisierten Glasfaserplatte



Die Phycocyaninprobe zeigte wie erwartet nur die β - und α -Banden, während die Enzymtestprobe, neben den β - und α -Banden eine kräftige Abbaubande zeigte, welche für die Sequenzierung der N-terminalen Aminosäure eingesetzt wurde.

Für dieses Peptid konnte N-terminal folgende, aus 7 Aminosäuren bestehende Sequenz eindeutig identifiziert werden:

Arginin-Glutamin-Alanin-Alanin-Serin-Glycin-Leucin

R - Q - A - A - S - G - L

Diese Sequenz läßt sich auf der α -Kette von Phycocyanin aus *Synechococcus* 6301 wiederfinden, beginnend ab Position 32 (Abbildung 21).

Abbildung 21: Sequenz der α -Kette des PC von *Synechococcus* 6301 (nach WALSH et al., 1980). Die identifizierte Sequenz ist hervorgehoben

1 S-K-T-P-L-T-E-A-V-A - A-A-D-S-Q-G-R-F-L-S 20

21 S-T-E-L-Q-V-A-F-G-R - F-R-Q-A-A-S-G-L-A-A 40

41 A-K-A-L-A-N-N-A-D-S - L-V-D-G-A-A-N-A-V-Y 60

61 S-K-F-P-Y-T-T-S-T-P - G-N-N-F-A-S-T-P-E-G 80

81 K-A-K-C-A-R-D-I-G-Y - Y-L-R-I-V-T-Y-A-L-V 100

101 A-G-G-T-G-P-I-D-E-Y - L-L-A-G-L-D-E-I-N-T 120

121 K-F-D-L-A-P-S-W-Y-V - E-A-L-K-Y-I-K-A-N-H 140

141 G-L-S-G-D-S-R-D-E-A - N-S-Y-I-D-Y-I-L-N-A-L-S 162

Nach Schneiden des Enzyms an Position 32 der α -Kette mußte ein Restpeptid von ca. 12.938 Dalton entstehen. Da aber kein Restpeptid dieser Länge gefunden wurde (4.3.2) muß ein weiterer proteolytischer Abbau erfolgen.

Die β -Kette wird auch abgebaut, aber die identifizierte Sequenz ist in dieser Untereinheit nicht zu finden, somit muß auch hier nach einem weiteren proteolytischen Abbau gesucht werden.

Wie bereits in Kapitel 4.3.2 dargestellt, tritt das 8.300 Dalton-Peptid in höheren Konzentrationen auf als die restlichen Peptide, aber die Abbaureaktionen gehen weiter, so daß mit Verlängerung der Inkubationszeit neue kleinere Peptide auftreten, während größere weiter abgebaut werden.

Die für das Hauptabbaupeptid (8.300 Da.) gefundene Schnittstelle kann ein erster Angriffspunkt des Enzyms sein, welcher der Schlüssel für die Fortsetzung der Reaktions-Kette sein könnte.

5. Diskussion der Ergebnisse

Die rasant fortschreitende industrielle Entwicklung in diesem Jahrhundert und der parallel steigende Konsum in unserer Gesellschaft haben zu großen Umweltbelastungen geführt. Das ökologische Gleichgewicht in der Natur wurde in vielen Fällen empfindlich gestört. Eine Bewußtseinsänderung in der Gesellschaft hinsichtlich Umweltschutz verlangt auch von der Wissenschaft eine Antwort zu diesem Thema. Verständlich ist daher auch das Interesse der Forschung, den Einfluß von Veränderungen der Umweltfaktoren auf Mikroorganismen zu untersuchen und zu erforschen.

Photoautotrophe, prokaryontische Cyanobakterien sind dabei oft für diese Studien verwendet worden. Sie sind einzellige oder filamentförmige Organismen mit photosynthetischen Eigenschaften, identisch denen der Chloroplasten der höheren Pflanzen und besitzen Chlorophyll a und β -Carotine, jedoch kein Chlorophyll b (STANIER, 1971; GLAZER, 1983). Sie zeichnen sich aber dadurch aus, daß sie ein erweitertes Lichtspektrum für die Photosynthese nutzen können (grün bis orange), durch die Bildung von besonderen, farbigen Proteinen, den Phycobiliproteinen (ELEY, 1971; BOGORAD, 1975).

Die Phycobiliproteine (Phycoerythrin, Phycocyanin und Allophycocyanin) sind in der Zelle zu makromolekularen Strukturen aggregiert, den Phycobilisomen, welche an der Außenseite der Thylakoidmembran regelmässig verteilt sind und kristalline Formen bilden (BRYANT et al., 1979; GLAZER et al., 1979b; WANNER and KÖST, 1980).

Die zu den Phycobilisomen aggregierten Phycobiliproteine sind die Hauptlichtsammelpigmente der Cyanobakterien. Die aufgenommene Energie wird an das Photosystem II übertragen (MANODORI et al., 1984).

Durch Veränderungen in der Umwelt werden für Cyanobakterien Mangelbedingungen geschaffen, wobei der erste zu beobachtende Effekt

ein Verlust an Phycobiliproteinen ist. Die typische blau-grüne Färbung der Cyanobakterien schlägt dabei in gelb-grün um.

Mehrere Autoren haben sich bereits mit den Effekten einiger Mangelbedingungen befaßt. Ein erster bedingender Faktor ist sicherlich das Licht, wobei nicht nur Quantität sondern auch Qualität des Lichtes die Phycobiliprotein-Biosynthese bzw. den Abbau beeinflussen (BENNET and BOGORAD, 1973; BOGORAD, 1975; TANDEAU de MARSAC, 1977; BRYANT and COHEN-BAZIRE, 1981). Photoreversible Pigmente, welche die Phycobiliprotein-Biosynthese regulieren sollen, wurden bereits isoliert und "Phycochrome" genannt (SCHEIBE, 1972; BJÖRN and BJÖRN, 1976; BJÖRN, 1978).

Auch die Verfügbarkeit vieler für den Organismus lebensnotwendiger Substanzen wie CO₂ (ELEY, 1971; MILLER and HOLT, 1977), Phosphat (IHLENFELDT and GIBSON, 1975), Eisen (SHERMAN and SHERMAN, 1983), Stickstoff (ALLEN and SMITH, 1969) oder Schwefel (SCHMIDT, 1982) beeinflussen den Phycobiliproteingehalt bei Cyanobakterien.

Die meisten vorliegenden Studien beziehen sich auf Stickstoffmangel. So wurde, wie bereits in der Einleitung ausführlicher berichtet, unter diesen Umständen neben dem Abbau von Phycocyanin eine Abnahme an intrazellulären Strukturen und ein Aufbau von Speicherprodukten (LAU et al., 1977; ALLEN et al., 1980; YAMANAKA and GLAZER, 1980; STEVENS et al., 1981), die Differenzierung von Stickstoff-fixierenden Zellen - den Heterocysten (HASELKORN, 1978) - sowie eine Minderung der Proteinbiosynthese und eine Steigerung des Proteinabbaues (OWBY et al., 1979) beobachtet.

Ferner wurde auch über zwei Protease-Systeme berichtet, die "in vitro" die Proteine der Zelle abbauen:

- 1) Eine lösliche, calciumabhängige Protease die, außer den Phycobiliproteinen, "in vitro" die meisten Proteine der Zelle abbaut, die während der Heterocysten-Differenzierung unter N-Mangel verschwinden (WOOD and HASELKORN, 1977, 1979, 1980; LOCKAU et al., 1988).
- 2) Eine membrangebundene Protease, welche in vitro nur die Phycobiliproteine abbaut (FOULDS and CARR, 1977; WOOD and HASELKORN, 1977, 1979, 1980).

Viel weniger als über Stickstoffmangel ist über Schwefelmangel bekannt. Wie unter anderen Mangelbedingungen wurde für Synechococcus 6301 (ein einzelliges Cyanobakterium) unter Schwefelmangel Abbau von Phycocyanin beobachtet (SCHMIDT et al., 1982; Köst et al., 1983). An diesem Organismus wurden von WANNER et al. (1986) parallel NO_3^- - und SO_4^{2-} -Mangel untersucht, wobei die Veränderungen in beiden Fällen nicht identisch verliefen. Während nach 70 Stunden unter beiden Mangelbedingungen ein Abbau der löslichen Proteine und Chlorophylle sowie das Speichern von Glycogen beobachtet werden konnte, sind nur unter Schwefelmangel zusätzlich Poly- β -Hydroxybutter-Säure und kugelförmige Zytoplasma-Einschlüsse zu finden.

Alle Mangelmerkmale sind bis zu einem gewissen Grad reversibel, wenn zu der Mangelkultur das fehlende Ion zugegeben wird.

Bei der Regenerierung wird Phycocyanin synthetisiert, die Speicherprodukte werden abgebaut und erst, wenn der Zellzustand sich normalisiert hat, beginnt die Zellteilung.

Bei den Versuchen mit Synechococcus 6301 unter NO_3^- -Mangel und SO_4^- -Mangel verlief die Regeneration nicht parallel. So hatten sich NO_3^- -Mangel-Zellen nach 9 Stunden in Vollmedium praktisch vollständig regeneriert, während Zellen nach SO_4^- -Mangel in derselben Zeit noch starke Mangelmerkmale aufwiesen (WANNER et al., 1986).

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, nach Proteasen zu suchen, die den Abbau von Phycocyanin unter Schwefelmangel verursachen. Nach Isolierung und Anreicherung des Enzyms sollte der "in vitro"- Abbau von Phycocyanin getestet werden. Hierbei sollte sowohl nach der Schnittstelle durch das Enzym als auch nach Phycocyanin-Abbauprodukten gesucht werden.

Gearbeitet wurde mit Synechococcus 6301, wobei der Organismus in Standardmedium (STANIER et al., 1971) sowie unter Sulfatmangel mit verschiedenen Schwefelquellen angezogen wurde.

Für den Phycocyaninabbau "in vitro" wurde das Phycocyanin aus normal gewachsenen Synechococcus 6301-Kulturen gewonnen und durch Trennung an DEAE-Cellulose sowie Isoelektrischer Fokussierung gereinigt.

5.1 Phycocyaninabbauende Aktivität in Kulturen von Synechococcus 6301 unter normalen Bedingungen und Schwefelmangel

Die Entwicklung einer Schwefelmangel-Kultur von Synechococcus 6301 verläuft bezüglich des Chlorophyll- und Phycocyanin-Gehaltes für die ersten 20 Stunden ähnlich wie im Vollmedium. Ab diesem Zeitpunkt werden zunehmend Unterschiede zwischen der Kontrolle und der S-Mangelkultur sichtbar. Dieses kann so interpretiert werden, daß das mit dem Inokulum zugegebene Sulfat aufgebraucht ist. Ab der 24. Stunde werden bei der S-Mangel-Kultur die Phycocyanine abgebaut, so daß nach 43 Stunden praktisch kein Phycocyanin (O.D.₆₂₀ nm) mehr zu messen ist (Abb. 2). Der Chlorophyllgehalt bleibt dabei unverändert und erst am Ende dieser Periode (47. Stunde) läßt sich eine leichte Chlorophyll-Abnahme erkennen.

Die Zugabe von Sulfat (Na_2SO_4) zu der S-Mangelkultur zu diesem Zeitpunkt (in der 47. Stunde) bewirkt nach einer Lag-Phase von ca. 5 Stunden eine drastische Steigerung des Phycocyaningehaltes. Eine Zunahme an Chlorophyll konnte erst nach einer Lag-Phase von 10 Stunden beobachtet werden, die damit etwa doppelt so lang ist wie beim Phycocyanin.

Dieses ist ein weiterer Beleg dafür, daß bei der Regenerierung von Kulturen, die unter Mangelbedingungen gehalten worden waren, zuerst die Phycocyanine synthetisiert werden, bevor die Zellteilung beginnt (LAU et al., 1977; SCHMIDT et al., 1982; KÖST et al., 1983).

Wie aus der Arbeit von SCHMIDT et al. (1982) hervorgeht, kann Synechococcus 6301 zahlreiche S-Verbindungen als einzige Schwefelquelle nutzen, aber nur bei einigen davon erfolgt gutes Wachstum, vergleichbar mit dem Wachstum in Sulfatmedium. Andere schwefelhaltige Substanzen erlauben zwar ein Wachstum, aber die Kulturen haben typische Mangelmerkmale.

Es wurde hier nach einem Sulfatersatz gesucht, der in den Kulturen trotz Mangelmerkmalen relativ gute Ausbeute erbringt, um in diesen Kulturen nach phycocyaninabbauenden Proteasen zu suchen.

Sowohl DL-Homocystein, als auch L-Thiazolidin-4-Carbonsäure ergaben gelb-grüne, gut wachsende Kulturen. Sie erwiesen sich somit als geeignete alternative S-Quellen für die hier angestrebten Ziele.

Die Suche nach Proteasen wurde an vier, bezüglich der Schwefelquelle unterschiedlichen Synechococcus 6301-Kulturen durchgeführt: $MgSO_4$ als Kontrolle;

ohne Sulfat als S-Mangel;

DL-Homocystein und L-Thiazolidin-4-Carbonsäure
als Mangel-Kulturen mit besserer Ausbeute.

Die enzymatische Aktivität wurde sowohl im Rohextrakt als auch in der Pelletsuspension (3.3.2) der jeweiligen Kultur untersucht.

Die proteolytischen Untersuchungen wurden mittels zweier unterschiedlicher Methoden durchgeführt, nämlich einerseits der Spaltung von Azocasein (nach FELLER and ERISMANN, 1978), einer verbreiteten Methode zur Messung von Endopeptidasen, und andererseits dem Abbau von Phycocyanin, um spezifische, phycocyaninabbauende Proteasen zu erfassen.

Die mit den zwei Methoden erzielten Ergebnisse stimmen nicht ganz überein (Tabelle 4). Während Azocaseinspaltung im Prinzip sowohl für die Pelletsuspension als auch für den Rohextrakt beobachtet wurde, hat sich nur für die Pelletsuspension phycocyaninabbauende Aktivität gezeigt (Abb. 4). Nach Dialysieren des Rohextraktes sowie der Pelletsuspension gegen 20 mM Tris/HCl pH 8 ging jedoch die Aktivität des Rohextraktes gegenüber Azocasein praktisch verloren. Die Aktivität der Pelletsuspension blieb dabei erhalten, sowohl gegenüber Azocasein als auch gegenüber Phycocyanin. Die Zugabe von Protease-Kofaktoren wie Magnesium, Mangan und/oder L-Cystein zum Azocasein-Enzymtest mit dem dialysierten Rohextrakt hat die verlorene Aktivität nicht wieder hergestellt. So müssen bei der Azocaseinspaltung durch den Rohextrakt und die Pelletsuspension unterschiedliche Enzyme beteiligt sein.

Daß Phycocyanin nur von der Pelletsuspension und nicht vom Rohextrakt abgebaut wird, ist ein Hinweis darauf, daß das phycocyanin-

abbauende Enzym membrangebunden ist. Azocasein hingegen, als gewöhnliches Proteasesubstrat (FELLER and ERISMANN, 1978), kann von unterschiedlichen Proteasen abgebaut werden, die auch im Rohextrakt vorhanden sind und beim Dialysieren verloren gehen.

Die in dieser Arbeit beobachtete Azocaseinspaltung durch den Rohextrakt könnte von löslichen Proteasen wie den von WOOD and HASELKORN (1979, 1980) bzw. von LOCKAU et al. (1988) beschriebenen verursacht werden. Die Aktivität des Rohextraktes gegenüber Azocasein wurde sowohl für normalgewachsene als auch für S-Mangel-Kulturen gefunden, was mit der Aussage von LOCKAU et al. (1988) übereinstimmt, nicht jedoch mit der von WOOD and HASELKORN (1980) behaupteten Neusynthese unter Mangelbedingungen.

Durch die Pelletsuspension wird nicht nur Phycocyanin abgebaut, sondern auch Azocasein gespalten. Dieses kann verschieden interpretiert werden:

- 1) Das phycocyaninabbauende Enzym ist nicht ganz spezifisch und greift beide Substrate an.
- 2) In der Pelletsuspension befinden sich außer dem phycocyaninabbauenden Enzym andere Proteasen, die Azocasein spalten können.

Mit beiden für diese Untersuchungen angewandten Methoden (Azocaseinspaltung bzw. Phycocyaninabbau) zeigte sich in den unterschiedlich angezogenen Kulturen die beste Aktivität für DL-Homocystein, gefolgt von L-Thiazolidin-4-Carbonsäure (Tabelle 4) als S-Quelle. Die Kulturen ohne Sulfat zeigten keine schlechten relativen Aktivitäten, aber das Wachstum ist in diesen Kulturen sehr gering. Auch für die Kontrolle ($MgSO_4$ -gezogene Kulturen) wurde proteolytische Aktivität gefunden, jedoch lagen die Werte ca. 1/2 niedriger als für DL-Homocystein.

Da diese membrangebundene enzymatische Aktivität "in vitro" Phycocyanin abbaut, ist anzunehmen, daß sie auch "in vivo" unter S-Mangel das Phycocyanin abbauen könnte.

Wenn die hier für S-Mangel beschriebenen Ergebnisse mit den bekannten Ergebnissen für N-Mangel verglichen werden, so läßt sich eine Korrelation herstellen. WOOD and HASELKORN (1979, 1980) haben auch eine membrangebundene, phycocyaninabbauende Aktivität beschrieben, die sowohl in normalen Kulturen als auch in N-Mangel-Kulturen von Anabaena vorhanden war. Jedoch konnte hier für Synechococcus 6301 unter S-Mangel nicht die von den Autoren berichtete 6- bis 10-fache Steigerung der Aktivität in Kulturen von Anabaena unter N-Mangel beobachtet werden. Die phycocyaninabbauende Aktivität war in S-Mangel-Kulturen von Synechococcus 6301 nur etwa doppel so groß wie in der Kontrolle. Die große Aktivitätssteigerung haben die Autoren allerdings bei den differenzierten Zellen, den Heterocysten, gefunden. Vegetative Zellen zeigten auch bei den o.g. Autoren nur doppelt bis dreifach höhere phycocyaninabbauende Aktivität.

Von FOULDS and CARR (1977) wurde eine sogenannte "Phycocyaninase" beschrieben, die während der Heterocysten-Differenzierung in Kulturen von Anabaena cylindrica das Phycocyanin abbaut. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von WOOD and HASELKORN (1979, 1980) und denen dieser Arbeit, wo die phycocyaninabbauende Aktivität in der Membranfraktion gefunden wurde, berichten FOULDS and CARR (1977) über 1:1 Verteilung zwischen Pellet und Überstand.

Daß die hier gefundene Enzymaktivität auch in Kulturen unter normalen Bedingungen auftritt, spricht dafür, daß unter allen Mangelbedingungen, zumindest bei ein und demselben Organismus die gleiche(n) Protease(n) für den Abbau von Phycocyanin zuständig sein könnte. Somit wäre, wie bereits von WOOD and HASELKORN (1980) behauptet, das Enzym immer vorhanden und würde nur unter Mangelbedingungen aktiviert.

Eine direkte Korrelation zwischen dem "in vivo"-Verlust an Phycocyanin und der proteolytischen Aktivität "in vitro" läßt sich nicht feststellen, da normal gewachsene Kulturen keinen Verlust an Phycocyanin aufweisen und doch proteolytische Aktivität "in vitro" zeigen. Das bedeutet, daß während der Aufarbeitung der Kultur das proteolytische System aktiviert wird.

In Versuchen mit und ohne Chloramphenicol (Chloramphenicol blockiert die Protein-Biosynthese) konnten WOOD and HASELKORN

(1980) beobachten, daß für die Steigerung der proteolytischen Aktivität in N-Mangelkulturen von Anabaena Proteinbiosynthese notwendig ist. Die Standard-Aktivität, die in normal gewachsenen Kulturen beobachtet worden war, wurde auch mit Chloramphenicol gemessen. Unter diesen Bedingungen war die Korrelation zwischen Phycocyaninabbau "in vivo" und Steigerung der proteolytischen Aktivität "in vitro" deutlich zu sehen.

Dieselben Autoren stellten fest, daß sowohl der Phycocyaninabbau "in vivo" als auch die Steigerung der proteolytischen Aktivität "in vitro" von der Intensität des Lichtes, in der das Wachstum stattfand, abhängig waren. Während im Dunkeln weder Phycocyaninabbau noch eine Steigerung der proteolytischen Aktivität stattfand, wurde im Licht beides beobachtet.

Im Gegensatz zu dem von ELEY (1971) bei Anacystis nidulans (Synechococcus 6301) und von MILLER and HOLT (1977) bei Synechococcus lividus beobachteten Abbau von Phycocyanin unter CO₂-Mangel haben WOOD and HASELKORN (1980) für Kulturen von Anabaena unter CO₂-Mangel weder Abbau von Phycocyanin "in vivo" noch eine Steigerung der proteolytischen Aktivität "in vitro" nachweisen können. Der zusätzliche Entzug von CO₂ bei N-Mangelkulturen hat die typischen N-Mangel-Reaktionen blockiert (WOOD and HASELKORN, 1980).

Das metabolische Signal unter den unterschiedlichen Mangelbedingungen könnte in der Zelle unmittelbar nach dem Auftreten der Restriktion aktiviert werden. Glutamin wurde von WOOD and HASELKORN (1980) als Hauptkandidat für diese regulatorische Funktion vorgeschlagen, nachdem sie beobachtet hatten, daß bei Zugabe von Methionin-Sulfoximin (einem irreversiblen Inhibitor der Glutaminsynthetase) zu Kulturen von Anabaena in Standardmedium der Abbau von Phycocyanin "in vivo" sowie die Steigerung der proteolytischen Aktivität "in vitro" verursacht wurden. Glutamin ist das erste Produkt bei der Ammoniumassimilation in Cyanobakterien. So ist es auch nicht verwunderlich, daß die Blockierung dieser ersten Reaktion automatisch N-Mangelbedingungen in der Zelle verursacht, auch wenn im Medium genügend Stickstoff vorhanden ist. Dieses muß aber nicht unbedingt bedeuten, daß Glutamin selbst der Regulator ist.

Es ist denkbar, daß die Zelle ein metabolisches Signal für Man-

gelbedingungen hat; aber ob es ein generelles Mangelsignal ist oder ob es unterschiedliche Signale für die unterschiedlichen Mangelbedingungen gibt, bleibt hier noch offen, auch wenn die Effekte im Prinzip ähnlich sind.

In Kulturen von Synechococcus 6301 wurde unter Schwefelmangel parallel zu anderen Mangelwirkungen, wie dem Rückgang des Phycocyaningehaltes, Nitritausscheidung beobachtet (KRÄMER, 1988). Da gleichzeitig die Aktivität der Nitritreduktase sinkt, ist anzunehmen, daß dieses Enzym die Nitritausscheidung reguliert. Dies würde bedeuten, daß beim Wachstum von Synechococcus 6301 unter S-Mangel die Enzyme des Stickstoffstoffwechsels beeinflußt werden, was auf eine enge Verbindung zwischen dem Stickstoff- und dem Schwefelstoffwechsel hinweist. Aber nicht nur unter S-Mangel wurde Nitritausscheidung beobachtet, sondern auch unter CO₂-Mangel (KRÄMER, 1988); so wäre denkbar, daß unterschiedliche Mangelbedingungen indirekt zu N-Mangel führen können. Dieses läßt vermuten, daß der Abbau von Phycocyanin unter allen Mangelbedingungen, sowie bei unterschiedlichen Organismen ein vergleichbarer Prozeß ist.

5.2 Extraktion und Anreicherung der membrangebundenen, phycocyaninabbauenden Protease(n)

Für die Massenkulturen zur Extraktion des membrangebundenen Enzyms wurde L-Thiazolidin-4-Carbonsäure als Schwefelquelle verwendet.

L-T-4-C sowie DL-Homocystein als Sulfatersatz erbrachten Kulturen mit Mangelmerkmalen, guter enzymatischer Aktivität und relativ gutem Wachstum. Da die Handhabung von L-T-4-C einfacher ist als die von DL-Homocystein und ersteres zudem auch günstiger zu bekommen ist, wurde L-T-4-C als Schwefelquelle ausgewählt.

L-T-4-C ist ein Analogon von Prolin, in dem die 4-Methylen-Gruppe durch Schwefel ersetzt ist.

Da bereits bewiesen wurde, daß L-2-Oxothiazolidin-4-Carboxylat, ein Analog des 5-Oxoprolins, von der Zelle aufgenommen wird und durch die 5-Oxo-L-Prolinase (die die Reaktion 5-Oxo-L-Prolin zu Glutamat katalysiert) in einer ATP-abhängigen Reaktion zu Cystein

und ADP abgebaut wird (Abb. 5; WILLIAMSON and MEISTER, 1981), ist anzunehmen, daß auf ähnliche Weise auch L-T-4-C zu Cystein abgebaut werden kann. Das so entstandene Cystein kann dann bei Aufbaureaktionen in der Zelle wie für den Schwefelstoffwechsel verwendet werden.

Für die Extraktion der membrangebundenen, phycocyaninabbauenden Aktivität wurden im Laufe dieser Arbeit mehrere Möglichkeiten und Methoden getestet. Durch Einfrieren der Synechococcus 6301-Zellen und Nachbehandeln der Pelletsuspension mit Ultraschall gelang es, einen phycocyaninabbauenden Extrakt zu gewinnen.

Bei dieser Methode werden mechanische Angriffe an der Zellmembran verübt und dadurch Membranproteine freigesetzt.

Der so gewonnene Enzymextrakt ist eine intensiv grün-gelb gefärbte Lösung. Durch Trennung an DEAE-Cellulose wurde der Enzymextrakt angereichert. Das Enzym selbst wird nicht an das DEAE-Cellulose-Gel gebunden, jedoch viel Begleitmaterial, so daß nach zwei Passagen eine helle, farblose Enzymprobe, mit relativ guter Aktivität erhalten wurde.

Das Ergebnis einer SDS-Gelelektrophorese-Trennung dieser angereicherten Enzymprobe ist in Abbildung 10, Bahn 2 dargestellt.

Es sind mehrere Banden zu sehen, hauptsächlich in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 30.000 und 40.000 Dalton. Der Vergleich dieses Bildes (Abb. 10, Bahn 2) mit denen der daneben liegenden Enzym-Test-Proben (Abb. 10, Bahnen 4-8) sowie mit mehreren anderen SDS-PAGE-Trennungen zeigt, daß die Bande bei ca. 35.000 Dalton das gesuchte Enzym enthalten könnte.

Mit dem so extrahierten und angereicherten Enzymextrakt wurden die weiteren Untersuchungen zur Veränderung des Phycocyanins durch den Einfluß des Enzyms, sowie für die Suche nach der Schnittstelle des Enzyms am Phycocyanin durchgeführt.

Leider ist die Ausbeute mit dieser Extraktionsmethode klein, so daß für weitere Reinigungsversuche des Enzyms große Mengen an Rohmaterial notwendig sind.

Durch Inkubation der Pelletsuspension mit dem Detergenz Triton X-

100 (2 vol %) konnte eine viel größere Ausbeute erzielt werden. Bei der Extraktion von membrangebundenen Proteinen mit Hilfe von Detergentien wie z.B. Triton X-100 werden die Membranlipide emulgiert und dabei die Proteine freigesetzt.

Für die Anreicherung dieses Extraktes wurde zuerst eine Ammoniumsulfatfällung von 0-90 % Sättigung durchgeführt, wobei nach dem Zentrifugieren der aktive Extrakt in eine auf den Überstand schwimmende Phase getrennt wurde.

Nach Auflösen des Extraktes in einem geringeren Volumen 10 mM Tris/HCl pH 8 und Dialysieren gegen denselben Puffer wurde die Enzymprobe noch durch Trennung an DEAE-Cellulose gereinigt. Die phycocyaninabbauende Aktivität wird auch bei diesem Extrakt nicht am Gel gebunden. Sie bleibt im Durchlauf.

In Tabelle 15 sind Proteingehalt, PC-abbauende Aktivität und spezifische Aktivität für den Rohextrakt sowie nach der 1. und nach der 2. DEAE-Cellulose-Reinigung dargestellt.

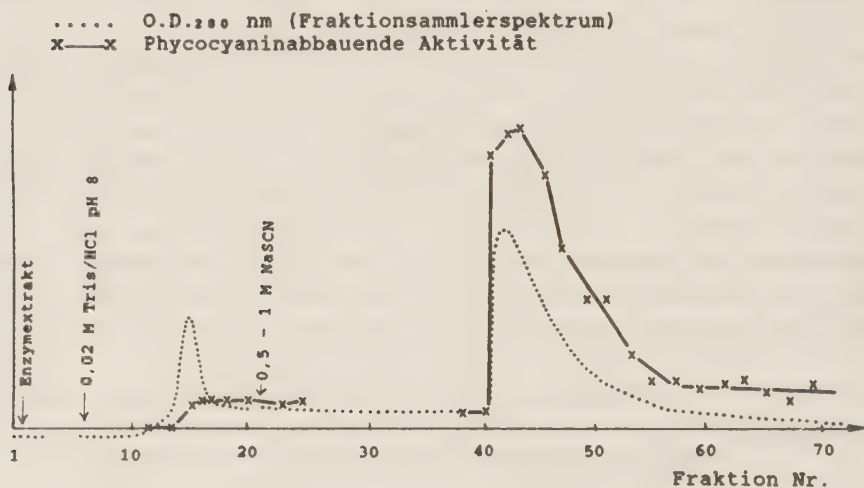
Um die Werte besser vergleichen zu können, wurden die Volumina nach den verschiedenen Reinigungsschritten angepaßt. Eine deutliche Abnahme des Proteingehaltes neben praktisch gleichbleibenden Aktivitätswerten ist dabei zu erkennen. Die spezifische Aktivität steigt daraus resultierend deutlich mit jedem Reinigungsschritt an.

Tabelle 15: Veränderung der enzymatischen Aktivität sowie des Proteingehaltes durch die Anreicherung des Enzymextraktes an DEAE-Cellulose

Reinigungsschritt	Proteingehalt mg/ml	PC-Abbau (OD ₆₂₀ Abnahme)	Spezifische Aktivität
Enzymextrakt	2,9	0,27	0,093
1. DEAE-Reinigung	1,9	0,29	0,153
2. DEAE-Reinigung	0,6	0,26	0,433

Der DEAE-Cellulose-vorgereinigte Enzymextrakt wurde noch an einem "MatrexTM-Gel-Blue-A" (Affinity Chromatography; Amicon) angereichert. Die phycocyaninabbauende Aktivität wurde an dem Blue-A-Affi-Gel gebunden und konnte mit einem 0,5 - 1,0 M NaSCN (Natriumthiocyanat)-Gradienten eluiert werden. Die Aktivitätskurve stimmt mit dem 280 nm-Spektrum des Fraktionssammlers überein (Abbildung 22).

Abbildung 22: Fraktionssammler-Spektrum und Aktivitätskurve nach Elution des Enzyms mit 0,5 - 1,0 M NaSCN von der Blue-A-Affi-Säule

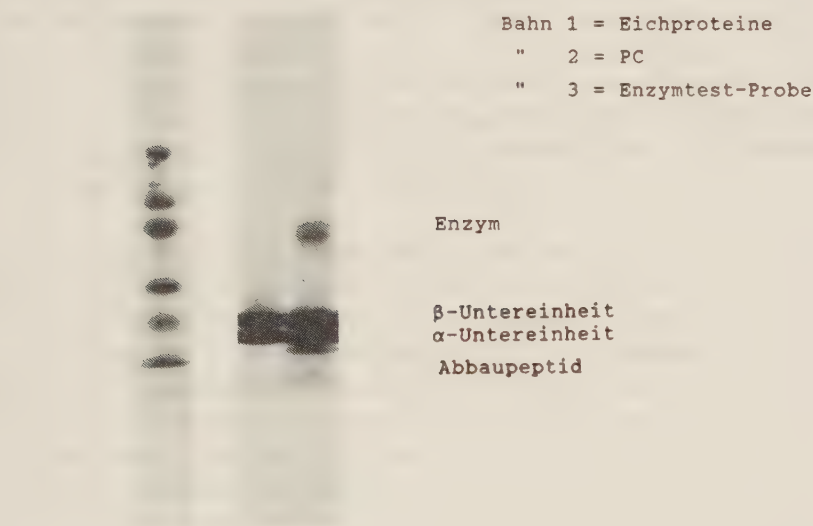


Die so angereicherte Enzym-Probe ist noch leicht grün-gelb gefärbt. Eine SDS-Gelelektrophorese-Trennung des Enzymextraktes in den drei Reinigungsstufen (Rohenzym -> nach Anreicherung an DEAE-Cellulose -> nach Anreicherung an Blue-A-Affi-Gel) ergab auch für das mit Triton X-100 extrahierte Enzym keine erkennbare spezifische Bande, wohl aber eine angereicherte Zone im gleichen

Molekulargewichts-Bereich wie bei der durch Ultraschall solubili-
sierten Probe (zwischen 30.000 und 40.000 Dalton).

Das SDS-Gelelektrophorese-Bild von unterschiedlich lang
inkubierten Enzym-Test-Proben zeigt bei 2 Stunden (Abbildung 23)
eine starke Bande (die nicht bei Phycocyanin allein vorkommt) di-
rekt unterhalb des 36.000 Dalton-Markers, welche in längere Zeit
inkubierten Proben schwächer wird. So könnte diese Bande das phy-
cocyaninabbauende Enzym enthalten.

Abbildung 23: Gelbild nach SDS-PAGE-Trennung von Phycocyanin und
Phycocyanin nach der Inkubation (2 h bei 37 °C) mit
dem durch Triton X-100 extrahierten Enzym



Sonstige Eigenschaften des Enzyms wie Reaktionsablauf, pH-
Optimum, Stabilität, etc. sind unabhängig von der Extraktions-
Methode für beide Extrakte gleich.

Das Problem bei der Extraktion mit Detergentien liegt darin, daß
nicht sichergestellt werden kann, inwieweit das Detergenz durch
die unterschiedlichen Reinigungsschritte eliminiert wird. Die bei

der Extraktion freigesetzten Proteine (Proteasen) können mit dem Detergenz aggregieren und Micellen "Protein-Detergenz" bilden (MOSS et al., 1978; 1984). So wäre es möglich, daß bei der Extraktion des Enzyms und während dessen Anreicherung ein gewisser Detergenzanteil mitgeschleppt wird, welcher nicht mit Sicherheit eliminiert werden kann. Neben der Tatsache, daß Detergenzien wie Triton X-100 ein störender Faktor bei der Proteinbestimmung sein können (BRADFORD, 1976), da Triton X-100 mit seiner Phenolgruppe wie Proteine bei 280 nm absorbiert, führte die Feststellung, daß Triton X-100 ab einer bestimmten Konzentration die O.D.₆₂₀ nm von Phycocyanin verändert, dazu, daß mit dieser Extraktionsmethode nicht weiter gearbeitet wurde.

Im Nachhinein läßt sich feststellen, daß die Eigenschaften beider Extrakte (Ultraschall- bzw. Triton X-100-extrahiertes Enzym) praktisch gleich sind.

Die angesprochenen Probleme könnten umgangen werden, indem bei den Aktivitäts-Untersuchungen neben der Messung des Phycocyanin-abbaues eine andere Methode angewandt wird, welche nicht von Triton X-100 beeinflusst wird, wie z.B. die Spaltung von Azocasein.

Beide hier diskutierten und zum Teil angewandten Extraktionsmethoden (Kälte plus Ultraschall sowie Triton X-100) wurden schon von WOOD and HASELKORN (1979, 1980) bei der Extraktion von membrangebundener, phycocyaninabbauender Aktivität aus Stickstoff-Mangel-Kulturen von *Anabaena* angewandt. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen ist das von den Autoren mit nichtionischen Detergentien (Triton X-100) extrahier- te Enzym sehr labil, wird an DEAE-Sephadex gebunden und mit 2 M NaCl + 1% Triton X-100 bei pH 7 eluiert. Widersprüchliche Ergebnisse mit dieser Enzympräparation bei der "in vitro"-Herauslösung von Radioaktivität aus ³⁵S-markierten Phycobilisomen haben die Autoren dazu gezwungen, nach einer Extraktionsmethode ohne Zusätze zu suchen, nämlich der Behandlung mit Ultraschall.

5.3 Eigenschaften des phycocyaninabbauenden Enzyms

In Kulturen von *Synechococcus* 6301 wurde eine membrangebundene,

phycocyaninabbauende Aktivität festgestellt (Abb. 4).

Diese Aktivität wurde in Schwefelmangel-Kulturen beobachtet und in geringerer Konzentration auch in normal gewachsenen Kulturen gefunden (Tab.4).

Die enzymatische Aktivität steigt bis zum 3. Tag mit dem Alter der Kultur an (Tab. 5).

Die Reaktion des Phycocyaninabbaues "in vitro" verläuft zu Beginn schneller und verlangsamt sich mit der Zeit (Abb. 4 und 8), wobei die Geschwindigkeit proportional zur Enzymmenge im Test ist. Dieses gilt sowohl für die Pelletsuspension als auch für den Enzymextrakt

In der Pelletsuspension und in dem Enzymextrakt läßt sich die phycocyaninabbauende Aktivität für kurze Zeit (1-3 Tage) bei 4 °C, für längere Zeit bei -20 °C lagern, ohne daß große Aktivitäts-Verluste auftreten (Tab. 6).

Bezüglich der Hitzestabilität haben sich für die Pelletsuspension unterschiedliche Ergebnisse für den Abbau von Phycocyanin und die Spaltung von Azocasein ergeben. Während nach 60 min bei 90 °C die Werte der Azocaseinspaltung keine Veränderung zeigten, wurde mit derselben erhitzten Probe nur 50 % des Phycocyaninabbaues erzielt (Tab. 7). Diese Ergebnisse des Phycocyaninabbaues wurden auch beim Erhitzen des Enzymextraktes beobachtet. Nach 5 min bei 90 °C wurde die phycocyaninabbauende Aktivität auf ca. die Hälfte reduziert. Eine Verlängerung der Hitzebehandlung auf 30 min hat aber keinen Einfluß auf die verbleibende Aktivität gezeigt (Tab. 10). Dieses spricht für ein proteolytisches System, bestehend aus einer Mischung aus hitzestabilen und hitzelabilen Proteasen, nicht nur in der Pelletsuspension, sondern auch in dem angereicherten Enzymextrakt. Für die Spaltung von Azocasein wäre dann der hitzestabile Anteil zuständig, während Phycocyanin von beiden abgebaut wird.

Die phycocyaninabbauende Aktivität der Pelletsuspension sowie die

des Enzymextraktes ist aktiv in einem pH-Bereich zwischen pH 7 und pH 9,5, mit einem Optimum bei pH 8,5 (Tab. 8 und 11). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von FOUDS and CARR (1977) überein. Auch WOOD and HASELKORN (1980) arbeiteten bei einem pH = 8 im Enzymtest. Die gemessene Aktivität verdoppelt sich mit einer pH-Einheit zwischen pH 6 und 8,5, ohne daß die O.D.₆₂₀ nm von Phycocyanin verändert wird. Ab pH 9 wird offensichtlich die dreidimensionale Struktur des Phycocyanin vom Puffer beeinflusst und die O.D.₆₂₀ nm verändert sich entsprechend.

Positive bzw. negative Ionen in einer Endkonzentration von 5 mM zeigten keinen Einfluß auf die phycocyaninabbauende Aktivität, weder bei der Pelletsuspension noch bei dem Enzymextrakt.

Der angereicherte Enzymextrakt ist auch in der Lage, Phycobilliproteine aus anderen Organismen abzubauen; jedoch waren die gemessenen Werte recht unterschiedlich (Tab. 12). Während Phycocyanin aus Mastigocladus laminosus kaum abgebaut wurde, hat sich gegen Phycocyanin bzw. Allophycocyanin aus Polypothrix eine größere Aktivität gezeigt als gegen die Kontrolle (Phycocyanin aus Synechococcus 6301). Phycocyanin aus Spirulina platensis sowie Phycoerythrin aus Pseudoanabaena wurden etwas schlechter abgebaut als die Kontrolle.

Auch Azocasein wurde durch den angereicherten Enzymextrakt gespalten. Daher könnte Azocasein als Substrat in Enzymtestversuchen neben Phycocyanin verwendet werden, um gewisse Probleme zu umgehen, wie z.B. die, die durch die Wechselwirkung von Detergenzien mit Phycocyanin entstehen, wenn solche bei der Extraktion des Enzyms verwendet werden (siehe 5.2).

Der Vergleich von mehreren elektrophoretischen Trennungen von angereicherten Enzymextrakten sowie Enzymtest-Proben (Abb. 10 und 23) deutet auf ein Molekulargewicht von ca. 35.000 Dalton für das phycocyaninabbauende Enzym.

Nach elektrophoretischer Trennung von Enzymtest-Proben läßt sich am Gelbild eine Abnahme der α - und β -Banden sowie das Auftreten einer neuen Abbaubande unterhalb des MG-Markers von 14.200 Dalton

beobachten. Die Zunahme dieser Bande sowie die Abnahme der α - und β -Banden ist sowohl von der Enzymmenge im Test als auch von der Inkubationszeit abhängig. Für intaktes Phycocyanin treten hingegen nur die unveränderten α - und β -Banden auf (Abb. 10, Tab. 13). Somit wird der Abbau von Phycocyanin durch den Enzymextrakt bewiesen.

5.4 Veränderungen an Phycocyanin durch den Abbau mit dem aus Schwefelmangel-Kulturen gewonnenen Enzymextrakt

Neben den "in vitro"-Untersuchungen zum Abbau von Phycocyanin bei Synechococcus 6301 durch eigene, membrangebundene Protease(n) anhand der Abnahme der Optischen Dichte bei 620 nm, wurden noch Veränderungen am Phycocyanin bei dem Abbau "in vitro" unter diesen Bedingungen untersucht.

Durch elektrophoretische Trennung von intaktem Phycocyanin, angereichertem Enzymextrakt sowie Enzymtestproben (Phycocyanin + Enzymextrakt) konnte in einer Zeitkinetik (Abb. 13-14) gezeigt werden, daß das Phycocyanin in der Enzymtest-Probe durch das Enzym abgebaut wird. Dabei ließ sich neben der Abnahme der α - und β -Banden (Proteinmengenverhältnisse) die Entstehung einer neuen Bande unterhalb des kleinsten Molekulargewichtsmarkers von 14.200 Da. beobachten. Diese Abbaubande muß ein chromophorhaltiges Peptid enthalten, da sie vor dem Anfärben des Geles sichtbar ist. Sowohl das Ausmaß der Abnahme (Abbau) bei den α - und β -Banden als auch die Zunahme der Abbaubande (Abbaupeptid) hängen von der Inkubationszeit (Abb. 13-14) sowie von der Enzymmenge im Test (Abb. 10) ab, das heißt vom Stadium des Abbaus. Jedoch ergaben kurze Zeiten und mehr Enzymextrakt eine größere Abbaubande als weniger Enzymextrakt und längere Inkubationszeiten. Beim Verlängern der Inkubationszeit (bis 24 Stunden, Tab.13) werden die α - und β -Ketten weiter abgebaut, ohne daß die Menge an Abbaupeptid wesentlich zunimmt.

Um Näheres über die Abbaubande zu erfahren wurde gezielt eine SDS-Gelelektrophorese-Trennung für kleinere Peptide (2.510 - 16.950 Dalton) durchgeführt. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß bei dem Abbau von Phycocyanin durch den Enzymextrakt mehrere Ab-

baupeptide entstehen (Abb. 15-16). Hierbei entsteht ein Hauptpeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 8.300 Da. neben mehreren anderen Peptiden in geringeren Mengen. Aus Abb. 15-16 sowie Tab. 14 hat sich eindeutig gezeigt, daß mit fortlaufender Inkubationszeit immer kleinere Peptide entstehen, was für einen kontinuierlichen Abbau spricht. Während die Bande des 8.300 Da.-Peptids fortlaufend (mindestens bis 2 Stunden) zunimmt, entstehen andere Peptide erst nach bestimmten Inkubationszeiten, wenn andere, früher entstandene Peptide schon wieder abgebaut werden. Dieses könnte bedeuten, daß es eine erste Schnittstelle geben muß, welche zu dem 8.300 Da.-Peptid führt, und daß das Phycocyanin-Molekül dadurch so verändert wird, daß ein weiterer Abbau möglich gemacht wird. Längere Inkubationszeiten (24 h) haben gezeigt, daß - obwohl die α - und β -Peptide weiter abgebaut werden - die Bande des 8.300 Da.-Abbaupeptids doch nicht wesentlich zunimmt. Das ist ein Hinweis darauf, daß in weiteren Stadien des Abbaus alle Peptide weiter abgebaut werden können, auch das 8.300 Dalton-Peptid.

Durch den Nachweis von Chromopeptiden (kleinere chromophorhaltige Peptide, die am Elektrophorese-Gel nicht erfaßt werden) konnte ein weiteres Stadium des Phycocyanin-Abbaus gezeigt werden. Andere nicht chromophorhaltige, farblose Peptide wären in diesem Stadium denkbar, wurden aber nicht nachgewiesen.

Die Menge der erhaltenen Chromopeptide steht in direkter Korrelation zu der Inkubations-Dauer (Abb. 18).

Die Chromopeptide konnten in wasserlösliche und Amylalkohollösliche getrennt werden (KÖST, 1978). Der größte Teil (67 %) waren wasserlösliche Chromopeptide, das heißt Chromophore, die noch an relativ langkettige Peptide (bzw. Peptide mit polaren Aminosäuren) gebunden sind. Die amyalkohollöslichen Chromopeptide - Chromophore mit einem kleineren oder unpolaren Aminosäureanteil - betrugen nur 33 % der gesamten Chromopeptidfraktion. Dieses ist ein weiterer Beweis für einen kontinuierlichen Phycocyaninabbau durch den Enzymextrakt, wobei bis zu dem hier untersuchten Zeitpunkt die Reaktion noch nicht sehr fortgeschritten ist, so daß an den Chromophoren noch relativ lange Peptidketten hängen.

Die Fortsetzung des Abbaus könnte entweder enzymatisch oder durch photooxidativen Abbau, wie es von SCHROPP (1986) gefordert wird, stattfinden.

SCHROPP (1986) hat in Medium von Synechococcus 6301 unter Schwefelmangel pyrrolische Substanzen nachgewiesen, die sich chromatografisch wie Gallenfarbstoffe verhalten und "in vitro" durch Chromsäure zu Imiden abgebaut werden. Da durch Photooxidation von Phycocyanobilin auch die obengenannten Substanzen entstanden, wird von der Autorin vermutet, daß die Bildung dieser Substanzen unter S-Mangel nicht enzymatisch, sondern durch Photooxidation erfolgt.

Möglich wäre auch, daß die Phycobiliproteine zunächst enzymatisch abgebaut werden und im fortgeschrittenen Stadium auch die Photooxidation eine Rolle spielt.

5.5 Schnittstelle des Enzyms an Phycocyanin

Das Abbaupeptid wurde durch SDS-Gelelektrophorese von den α - und β -Ketten des Phycocyanins getrennt und davon eine N-terminale Sequenzierung durchgeführt (ECKERSKORN et al., 1988). Für dieses Peptid konnte eindeutig die folgende, aus 7 Aminosäuren bestehende N-terminale Sequenz identifiziert werden:

Arginin-Glutamin-Alanin-Alanin-Serin-Glycin-Leucin

R - Q - A - A - S - G - L

Die identifizierte Sequenz läßt sich auf der α -Untereinheit von Synechococcus 6301-Phycocyanin wiederfinden, beginnend ab Position 32 (Abbildung 24).

Nach Schneiden durch das Enzym an der obengenannten Position 32 der α -Untereinheit müßte ein Restpeptid von ca. 13.000 Dalton entstehen. Ein Peptid dieser Größe wurde aber nicht gefunden (Abb. 16), was für einen weiteren Abbau spricht.

Außerdem wird die β -Kette doch auch abgebaut, obwohl die

identifizierte Sequenz in dieser Untereinheit nicht vorhanden ist. Somit muß auch hier ein weiterer proteolytischer Abbau stattfinden.

Abbildung 24: Sequenz der α - (WALSH et al., 1980) und β - (FREIDENREICH et al., 1978) Untereinheiten des Synechococcus 6301-Phycocyanins.

PC	1	α	S-K-T-P-L-T-E-A-V-A - A-A-D-S-Q-G-R-F-L-S	20
		β	T F D A F T K V V A - Q A D A R G E F L S	
	21	α	S-T-E-L-Q-V-A-F-G-R - F-R-Q-A-A-S-G-L-A-A	40
		β	D A Q L D A S L R L V A E G N K R I D T	
	41	α	A-K-A-L-A-N-N-A-D-S - L-V-D-G-A-A-N-A-V-Y	60
		β	V N R I T G N A S S I V A N A A R A L F	
	61	α	S-K-F-P-Y-T-T-S-T-P - G-N-N-F-A-S-T-P-E-G	80
		β	A E Q P S L I A P G G N A Y T N R M A A	
	81	α	K-A-K-C*A-R-D-I-G-Y - Y-L-R-I-V-T-Y-A-L-V	100
		β	C*L R D M E I I L R Y V T I A V F T G D	
	101	α	A-G-G-T-G-P-I-D-E-Y - L-L-A-G-L-D-E-I-N-T	120
		β	A S I L D D R C*L D G L R E T Y L A S G	
	121	α	K-F-D-L-A-P-S-W-Y-V - E-A-L-K-Y-I-K-A-N-H	140
		β	V P G A L V A E G V R K M K D A A V A I	
	141	α	G-L-S-G-D-S-R-D-E-A - N-S-Y-I-D-Y-I-L-N-A-L-S	162
		β	V S D R N G I T Q G D C*S A I S E L G S Y F	
	163	β	D K A A A A V A	

Die identifizierte Sequenz ist hervorgehoben und unterstrichen
 C* zeigt die Bindestelle zwischen der α - und β -Kette an
 C* zeigt die Bindestellen der Chromophore an

Andererseits läßt sich aus der Berechnung der Proteinmengenverhältnisse in einer Probe (Tab. 13 c) erkennen, daß die Abnahme der α -Kette in etwa der Zunahme des Abbaupeptids entspricht, zumindest im ersten Stadium des Abbaues. Das hieße, daß es zu Beginn der Reaktion eine Korrelation zwischen dem Abbau der α -Kette und der Menge des untersuchten Peptids geben könnte.

Nach den Untersuchungen von SCHIRMER et al. (1987) ist die dreidimensionale Struktur des cyanobakteriellen C-Phycocyanins - trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenz - für alle Organismen praktisch gleich. So könnte die hier identifizierte Schnittstelle auf die von den Autoren veröffentlichte dreidimensionale Struktur des C-Phycocyanins von Mastigocladus laminosus übertragen werden.

In Abbildung 25a ist die Position 32 der α -Untereinheit mit einem Pfeil markiert.

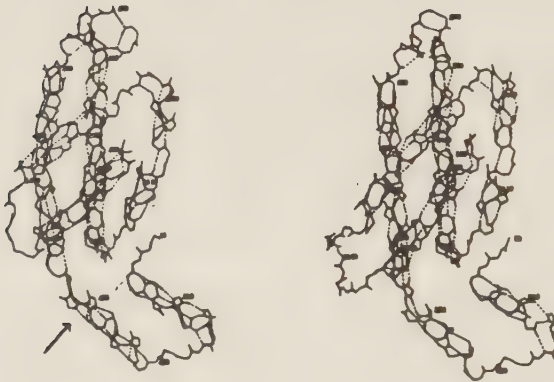
Wird das ($\alpha\beta$)-Monomer an der angegebenen Stelle der α -Untereinheit (Pfeil in Abb. 25b) gespalten, so könnte dieses die Umstrukturierung des Monomers bewirken, was in erster Linie das Hauptabbaupeptid ergeben würde, neben der β -Untereinheit und eventuell auch kleineren Peptiden, welche nicht an dem SDS-Elektrophorese-Gel erfaßt werden können. Die identifizierte Schnittstelle wäre ein erster Angriffspunkt des Enzyms und könnte der Schlüssel für den weiteren Abbau sein.

Es wäre auch möglich, daß nicht nur eine Protease für diese Aufgaben zuständig ist, sondern ein Protease-System vorliegt, wo ein Enzym für den ersten Angriff zuständig ist und ein anderes für den weiteren Abbau. Dieses würde die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der Hitzestabilität des Enzymextraktes erklären, wo ein Teil hitzelabil und der andere hitzestabil zu sein scheint.

Nach Schneiden des Enzyms an der angegebenen Stelle der α -Untereinheit werden die außenstehenden x- und y-Helix-Ketten getrennt. Der verbleibene Rest würde dem kompakten Kern entsprechen, dessen dreidimensionale Struktur der der Globuline ähnlich ist (SCHIRMER et al., 1987). Somit wäre auch verständlich, daß diese Struktur stabiler ist, sich zunächst anhäuft und erst später abgebaut wird.

Abbildung 25: Struktur von Phycocyanin aus dem Cyanobakterium Mastigocladus laminosus (SCHIRMER et al., 1987)

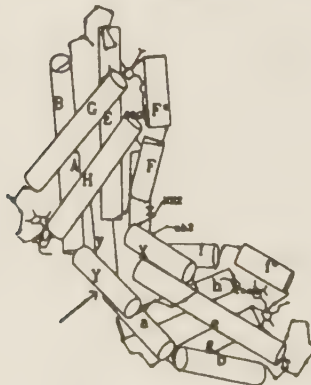
a) α - und β -Untereinheiten:



α -Untereinheit

β -Untereinheit

b) Struktur eines ($\alpha\beta$)-Monomers:



6. Zusammenfassung

1. In Kulturen von Synechococcus 6301 wurde ein membrangebundenes Protease-System festgestellt, welches die Phycobiliproteine der Zelle "in vitro" abbaut. Dieses System könnte auch für den "in vivo"-Abbau von Phycocyanin unter Mangelbedingungen verantwortlich gemacht werden.
2. Das Protease-System ist sowohl in Sulfatmangel-Kulturen als auch - mit verminderter Aktivität - in Kulturen unter normalen Bedingungen vorhanden. Somit darf spekuliert werden, daß das Protease-System unter allen Mangelbedingungen gleich sein könnte. Es wäre in der Zelle vorhanden und würde "in vivo" unter Mangelbedingungen, "in vitro" bei der Bearbeitung der Kultur aktiviert.
3. Um eine Kultur von Synechococcus 6301 mit Mangelmerkmalen, relativ guter Ausbeute und guter enzymatischer Aktivität "in vitro" zu bekommen, wurden mehrere schwefelhaltige Substanzen als Sulfatersatz in S-Mangelmedium untersucht. Sowohl mit L-Thiazolidin-4-Carbonsäure als auch mit DL-Homocystein ergaben sich die gesuchten Eigenschaften. L-Thiazolidin-4-Carbonsäure wurde bei den für die Extraktion des Enzyms notwendigen Massenkulturen verwendet.
4. Durch Einfrieren der Zellen und Nachbehandeln der Pelletsuspension mit Ultraschall wurde ein Enzymextrakt gewonnen, welcher das aus demselben Organismus extrahierte C-Phycocyanin "in vitro" abbaut. Durch mehrere Passagen an DEAE-Cellulose wurde der Enzymextrakt angereichert.

5. Der Vergleich mehrerer SDS-Gelelektrophorese-Trennungen von dem angereicherten Enzymextrakt deutet auf ein Molekulargewicht des Enzyms von ca. 35.000 Dalton hin.
6. Das Protease-System ist verhältnismäßig stabil, sowohl in der Pelletsuspension (noch membrangebunden) als auch als Enzymextrakt. Es läßt sich für kurze Zeit (1-2 Tage) bei 4 °C, für längere Zeit bei -20 °C lagern, ohne daß große Aktivitäts-Verluste auftreten.
Bezüglich der Hitzestabilität verhielten sich die Pelletsuspension sowie der Enzymextrakt so, als würden sie aus mehreren Komponenten bestehen. Ein Teil davon war hitzelabil, er wurde nach 5 min bei 90 °C schon inaktiviert; daneben fand sich eine hitzestabile Komponente, welche nach 30 min bei derselben Temperatur noch aktiv war.
7. Die phycocyaninabbauende Aktivität des Enzymextrakts sowie die der Pelletsuspension ist meßbar in einem pH-Bereich zwischen 7 und 9,5 mit einem Optimum bei pH 8,5.
8. Der Enzymextrakt aus *Synechococcus* 6301 ist auch in der Lage, Phycobiliproteine aus anderen Organismen abzubauen. Die dabei gemessenen Werte sind jedoch unterschiedlich, was für eine gewisse Spezifizität des Protease-Systems spricht.
Das Proteasesubstrat Azocasein wird auch von dem Enzymextrakt gespalten.
9. Durch SDS-Gelelektrophorese-Trennung von intaktem Phycocyanin, angereichertem Enzymextrakt sowie Enzymtestproben (PC + Enzym) konnte eindeutig gezeigt werden, daß Phycocyanin durch den Enzymextrakt abgebaut wird.
Der Abbau ist eine kontinuierliche Reaktion, wobei Phycocyanin zu Abbauprodukten unterschiedlicher Größe gespalten wird. Im Laufe einer Inkubationszeit von 60 min wurden Peptide mit Molekulargewichten von 9100, 8300, 6900, 5600, 4050, 2750 und 2200 Dalton gefunden.

10. Das 8.300 Da.-Peptid wurde als Hauptabbaupeptid identifiziert, da es als erstes entsteht und sich während der Inkubationszeit von 60 min akkumuliert.
Am Ende dieser Inkubationszeit ist ca. 50 % des Phycocyanins abgebaut, etwa 25 % davon lassen sich als 8.300 Da. Peptid wiederfinden, 18 % sind auf die restlichen 6 identifizierten Peptide verteilt und 8 % werden nicht mehr am Gel erfaßt.
11. Außer den obengenannten Abbaupeptiden konnten noch Chromopeptide nachgewiesen werden. Die Chromopeptide wurden in wasserlösliche (67 %) und amyalkohollösliche (33 %) getrennt.
12. Für das 8.300 Da.-Peptid wurde folgende N-terminale Sequenz identifiziert:

Arginin-Glutamin-Alanin-Alanin-Serin-Glycin-Leucin

R - Q - A - A - S - G - L

Diese Sequenz läßt sich auf der α -Untereinheit von Phycocyanin aus *Synechococcus* 6301 wiederfinden, beginnend ab Position 32.

Es ist wahrscheinlich, daß diese Schnittstelle der erste Angriffspunkt des Enzyms an Phycocyanin ist, welcher das ($\alpha\beta$)-Monomer destabilisiert und den weiteren Abbau erlaubt.

7. Literaturverzeichnis

- ALLEN, M.B. (1952)
The Cultivation of Myxophyceae // Arch. Mikrobiol. 17, 34-53
- ALLEN, M.B. (1960)
Pigments of some Photosynthetic Cryptomonads, abstract 10-37
In: O.Hoffmann-Ostenhof(ed), International Congress of Biochemistry, 4 th.
Viena 1958, Vol. XV // Pergamon Press London
- ALLEN, M.M. and SHMITH A.J. (1969)
Nitrogen Chlorosis in Blue-Green Algae // Arch. Mikrobiol. 69, 114-120
- ALLEN, M.M. and HUTCHISON, F. (1980)
Nitrogen Limitation and Recovery in the Cyanobacterium Aphanocapsa 6308
Arch. Mikrobiol. 128, 1-7
- ALLEN, M.M., HUTCHISON, F. and WEATHERS P.J. (1980)
Cyanophycin Granule Polypeptide Formation and Degradation in the Cyano-
bacterium Aphanocapsa 6308 // J. Bacteriology 141, 687-693
- ANDREWS, A.T. (1986)
Monographs on Physical Biochemistry. Electrophoresis: theory, techniques and
biochemical and clinical applications
Ed. A.R. Peacock and W.F. Harrington. Clarendon Press, Oxford
- ARNON, D.I. (1949)
Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts Polyphenoloxidases in Beta vulgaris
Plant Physiol. 24, 1-15
- BARTSCH, H.-J. (1975)
Taschenbuch Mathematischer Formeln, p.335
Harri Deutsch. Zürich . Frankfurt/M . Thun
- BENNET, A. and BOGORAD, L. (1971)
Properties of Subunits and Aggregates of Blue-Green Algal Biliproteins
Biochemistry 10, 3625-3634
- BENNET, A. and BOGORAD, L. (1973)
Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga
J. Cell Biology 58, 419-435
- BEUHLER, R.J., PIERCE, R.C., FRIEDMAN, L. and SIEGELMAN, H.W. (1976)
Cleavage of Phycocyanobilin from C-Phycocyanin. Separation and Mass Spectral
Identification of the Produkts // J. Biological Chemistry 251, 2405-2411
- BISHOP, J.E., LAGARIAS, J.C., NAGY, J.O., SCHOENLEBER, R.W., RAPOPORT, H.,
KLOTZ, A.V. and GLAZER, A.N. (1986)
Phycobiliprotein-Bilin Linkage Diversity. I. Structural Studies on A- and D-
Ring-Linked Phycocyanobilins // J. Biological Chemistry 261, 6790-6796

- BJÖRN, G.S. and BJÖRN, L.O. (1976)
Photochromic Pigments from Blue-Green Algae: Phycochromes a, b, c
Physiol. Plant. 36, 297-304
- BJÖRN, G.S. (1978)
Phycochrome d, a New Photochromic Pigment from the Blue-Green Alga, *Tolypothrix distorta* // Physiol. Plant. 42, 321-323
- BOGORAD, L. (1975)
Phycobiliproteins and Complementary Chromatic Adaptation
Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 369-401
- BONE, D.H. (1971)
Relationship between Phosphates and Alkaline Phosphatase of *Anabaena flosaquae* in Continuous Culture // Arch. Microbiol. 80, 147-153
- BOUSSIBA, S. and RICHMOND, A.E. (1980)
C-Phycocyanin as a Storage Protein in the Blue-Green Alga *Spirulina platensis*
Arch. Microbiol. 125, 143-147
- BRADFORD, M.M. (1976)
A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding
Anal. Biochemistry 72, 248-254
- BRICKER, T.M. and SHERMAN, L.A. (1984)
Triton X-114 Phase Fractionation of Membrane Proteins of the Cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2¹ // Arch. Biochemistry and Biophysics 235, 204-211
- BROWN, A.S., OFFNER, G.D., EHRHARDT, M.M. and TROXLER, R.F. (1979)
Phycobilin-Apoprotein Linkages in the α and β Subunits of Phycocyanin from the Unicellular Rhodophyte, *Cyanidium caldarium*. Amino Acid Sequences of ³⁵S-Labeled Chromopeptides // J. Biological Chemistry 254, 7803-7811
- BROWN, S.B., HOLROYD, J.A., TROXLER, R.F. and OFFNER, G.D. (1981)
Bili Pigment Synthesis in Plants. Incorporation of Haem into Phycocyanobilin and Phycobiliproteins in *Cyanidium caldarium*
Biochem. J. 194, 137-147
- BRYANT, D.A., GLAZER, A.N. and EISERLING, F.A. (1976)
Characterization and Structural Properties of the Major Biliproteins of *Anabaena* sp.* // Arch. Microbiol. 110, 61-75
- BRYANT, D.A., HIXSON, C.S. and GLAZER, A.N. (1978)
Structural Studies on Phycobiliproteins. III. Comparison of Bilin-Containing Peptides from the β Subunits of C-Phycocyanin, R-Phycocyanin and Phycoerythrocyanin // J. Biological Chemistry 253, 220-225
- BRYANT, D.A., GUGLIELMI, G., TANDEAU DE MARSAC, N., CASTETS, A-M and COHEN-BAZIRE, G. (1979)
The Structure of Cyanobacterial Phycobilisomes: a Model
Arch. Microbiol. 123, 113-127
- BRYANT, D.A. and COHEN-BAZIRE, G. (1981)
Effects of Chromatic Illumination on Cyanobacterial Phycobilisomes. Evidence for the Specific Induction of a Second Pair of Phycocyanin Subunits in *Pseudanabaena* 7409 Grown in Red Light // Eur. J. Biochem. 119, 415-424

- BYFIELD, P.G.H. and ZUBER, H. (1972)
Chromophore-Containing Peptide Sequences in C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus* // *FEBS LETTERS* 28, 36-40
- CABRAL, F. and SCHATZ, G. (1979)
High Resolution One- and Two-Dimensional Electrophoretic Analysis of Mitochondrial Membrane Polypeptides // *Methods in Enzymology* LVI, 602-613
- COLLOCOT, T.C. (1979)
Dictionary of Science and Technology
W. & R. Chambers, Edimburg. Ed. Omega, S.A., Barcelona
- CRESPI, H.L. and KATZ, J.J. (1969)
Exchangeable Hydrogen in Phycoerythrobilin // *Phytochemistry* 8, 759-761
- CZYGAN, F.-C. (1968)
Sekundär-Carotinoide in Grünalgen. I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen // *Arch. Mikrobiol.* 61, 81-102
- DAYHOFF, M.D. (1969)
Atlas of Protein Sequence and Structure
Vol. 4, National Biochemical Research Foundation / Silver Spring, Maryland
- DeLANGE, R.J., WILLIAMS, L.C. and GLAZER, A.N. (1981)
The Amino Acid Sequence of the β Subunit of Allophycocyanin
J. Biological Chemistry 256, 9558-9566
- De VASCONCELOS, L. and FAY, P. (1974)
Nitrogen Metabolism and Ultrastructure in *Anabaena cylindrica*.
I. The Effect of Nitrogen Starvation // *Arch. Microbiol.* 96, 271-179
- DUYSENS, L.N.M., AMESZ, J. and KAMP, B.M. (1961)
Two Photochemical Systems in Photosynthesis // *Nature* 190, 510-511
- ECKERSKORN, C., MEWES, W., GORETZKI, H. and LOTTSPEICH, F. (1988)
A New Siliconized Glass Fiber as Support for Protein-Chemical Analysis of Electroblooded Proteins // *Eur. J. Biochem. in press*
- EGELHOFF, T. and GROSSMAN, A. (1983)
Cytoplasmic and Chloroplast Synthesis of Phycobilisome Polypeptides
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3339-3343
- ELEY, J.H. (1971)
Effect of Carbon Dioxide Concentration on Pigmentation in The Blue-Green Alga *Anacystis nidulans* // *Plant and Cell Physiol.* 12, 311-316
- FELLER, U. and ERISMANN, K.H. (1978)
Veränderungen des Gaswechsels und der Aktivitäten Proteolytischer Enzyme während der Seneszenz von Weizenblättern (*Triticum aestivum* L.)
Z. Pflanzenphysiol. 90, 235-244
- FLEMING, H. and HASELKORN, R. (1973)
Differentiation in *Nostoc muscorum*: Nitrogenase Is Synthesized in Heterocysts
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2727-2731

- FOULDS, I.J. and CARR, N.G. (1977)
A Proteolytic Enzyme Degrading Phycocyanin in the Cyanobacterium *Anabaena cylindrica* // FEMS Microbiology Letters 2, 117-119
- FRANK, G., SIDLER, W., WIDMER, H. and ZUBER, H. (1978)
The Complete Amino Acid Sequence of Both Sununits of C-Phycocyanin from the Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 1491-1507
- FREIDENREICH, P., APELL, G.S. and GLAZER, A.N. (1978)
Structural Studies on Phycobiliproteins. II. C-Phycocyanin: Amino Acid Sequence of the β Subunit. Specific Cleavage of the α Subunit
J. Biological Chemistry 253, 212-219
- FRIGA, G.M., BORBELY, G. and FARKAS, G.L. (1981)
Accumulation of Guanosine Tetraphosphate (ppGpp) Under Nitrogen Starvation in *Anacystis nidulans*, a Cyanobacterium // Arch. Microbiol. 129, 341-343
- FÜGLISTALLER, P., SUTER, F. and ZUBER, H. (1983)
The Complete Amino-Acid Sequence of Both Subunits of Phycoerythrocyanin from the Thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 691-712
- GANTT, E. and CONTI, S.F. (1966)
Granules Associated with the Chloroplast Lamellae of *Porphyridium cruentum*
J. Cell Biology 29, 423-434
- GANTT, E. and LIPSCHULTZ, C.A. (1972)
Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. I. Isolation
J. Cell Biology 54, 313-324
- GANTT, E. and LIPSCHULTZ, C.A. (1974)
Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*: Pigment Analysis
Biochemistry 13, 2960-2966
- GANTT, E. (1977)
Recent contributions in Phycobiliproteins and Phycobilisomes
Photochemistry and Photobiology 26, 685-589
- GANTT, E. (1981)
Phycobilisomes^{1,2} // Ann.Rev.Plant.Physiol. 32, 327-347
- GEKELER, W. (1988)
Phytochelathine Vorkommen im Pflanzenreich und Untersuchungen zur Biosynthese
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München
- GIOVANELLI, J., MUDD, S.H. and DATKO, A.H. (1978)
Homocysteine Biosynthesis in Green Plants. Physiological Importance of the Transsulfuration Pathway in *Chlorella Sorokiniana* Growing under Steady State Conditions with Limiting Sulfate // J. Biological Chemistry 253, 5665-5677
- GLAZER, A.N. and COHEN-BAZIRE, G. (1971)
Subunit Structure of the Phycobiliproteins of Blue-Green Algae
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1398-1401

- GLAZER, A.N. and FANG, S. (1973a)
Chromophore Content of Blue-Green Algal Phycobiliproteins
J. Biological Chemistry 248, 659-662
- GLAZER, A.N. and FANG, S. (1973b)
Formation of Hybrid Proteins from the α and β Subunits of Phycocyanins of Unicellular and Filamentous Blue-Green Algae
J. Biological Chemistry 248, 663-671
- GLAZER, A.N. and BRYANT, D.A. (1975)
Allophycocyanin B (λ_{max} 671, 618 nm). A New Cyanobacterial Phycobiliprotein
Arch. Microbiol. 104, 15-22
- GLAZER, A.N. and COHEN-BAZIRE, G. (1975)
A Comparison of Cryptophytan Phycocyanins // Arch. Microbiol. 104, 29-32
- GLAZER, A.N. and HIXSON, C.S. (1977)
Subunit Structure and Chromophore Composition of Rhodophytan Phycoerythrins
J. Biological Chemistry 252, 32-42
- GLAZER, A.N., HIXSON, C.S. and DeLANGE, R.J. (1979a)
Determination of the Number of Thioether-Linked Cysteine Residues in Cytochromes c and Phycobiliproteins // Analytical Biochemistry 92, 489-496
- GLAZER, A.N., WILLIAMS, R.C., YAMANAKA, G. and SCHACHMAN, H.K. (1979b)
Characterization of Cyanobacterial Phycobilisomes in Zwitterionic detergents
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6162-6166
- GLAZER, A.N. (1983)
Comparative Biochemistry of Photosynthetic Light-Harvesting Systems
Ann. Rev. Biochem. 52, 125-157
- GLICK, R.E. and ZILINSKAS, B.A. (1982)
Role of the Colorless Polypeptides in Phycobilisome Reconstitution from Separated Phycobiliproteins^{1,2} // Plant Physiol. 69, 991-997
- GRABOWSKI, J. and GANTT, E. (1978a)
Photophysical Properties of Phycobiliproteins from Phycobilisomes: Fluorescence Lifetimes, Quantum Yields and Polarization Spectra
Photochemistry and Photobiology 28, 39-45
- GRABOWSKI, J. and GANTT, E. (1978b)
Excitation Energy Migration in Phycobilisomes: Comparison of Experimental Results and Theoretical Predictions
Photochemistry and Photobiology 28, 47-54
- GROMBEIN, H. RÜDIGER, W. and ZIMMERMANN, H. (1975)
The Structures of the Phytochrome Chromophore in Both Photoreversible Forms
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1709-1714
- HASELKORN, R. (1978)
Heterocysts // Ann. Rev. Plant Physiol. 29, 312-344
- HEINLE, H., SAWATZKI, G. and WENDEL, A. (1976)
Glutathionbiosynthese, VII⁽¹⁻³⁾ The Biosynthese von Glutathion in Humnerythrozyten // Hoppe-Zeyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1457-1458

HENKELMANN, G. (1984)

Quantitative Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von *Synechococcus* 6301 bei verschiedenen Wachstumsbedingungen unter Berücksichtigung anderer zellulärer Bestandteile und morphologischer Daten // Diplomarbeit an der LMU/München

IHLENFELDT, M.J.A. and GIBSON, J. (1975)

Phosphate Utilization and Alkaline Phosphatase Activity in *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*) // Arch. Microbiol. 102, 23-28

JOHN, W. (1986)

Phycocyanine aus *Mastigocladus laminosus* und *Spirulina platensis*: Biochemische Charakterisierung, Spektroskopie und Energietransfer in Abhängigkeit vom Aggregationszustand

Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU/München

JOUANEAU, Y., LEBECQUE, S. and VIGNAIS, P.M. (1984)

Ammonia and Light Effect on Nitrogenase Activity in Nitrogen-Limited Continuous Cultures of *Rhodospseudomonas capsulata*. Role of Glutamine Synthetase
Arch. Microbiol. 139, 326-331

KLEIN, G., GROMBEIN, S. and RÜDIGER, W. (1977)

On the Linkages between Chromophore and Protein in Biliproteins, VI⁽¹⁾.

Structure and Protein Linkage of the Phytochrome Chromophore

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1077-1079

KLOTZ, A.V. and GLAZER, A.N. (1985)

Characterization of the Bilin Attachment Sites in R-Phycoerythrin
J. Biological Chemistry. 260, 4856-4863

KÖST-REYES, E., KÖST, H-P. and RÜDIGER, W. (1975)

Nachweis von Cystein als bindende Aminosäure in B-Phycoerythrin

Justus Liebigs Annalen der Chemie, 1975, 1594-1600

KÖST, E. (1978)

Untersuchungen zur Protein-Chromophor-Bindung unter Verwendung

der radioaktiven Markierung mit ³⁵S am Beispiel von B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum*

Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU/München

KÖST-REYES, E. and KÖST, H-P. (1979)

The Protein Chromophore Bond in B Phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*.
Radiosulfur Labeling Experiments // Eur. J. Biochem. 102, 83-91

KÖST, H-P. (1974)

Strukturuntersuchungen an den Phycobiliproteiden B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* und C-Phycocyanin aus *Anacystis nidulans*

Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU/München

KÖST, H-P., RATH, K., WANNER, G. and SCHEER, H. (1981)

Phycobilisomes and Isolated Phycobiliproteins. Effect of Glutardialdehyde and Benzoquinone on Fluorescence // Photochem. and Photobiol. 34, 139-143

KÖST, H-P. and BENEDIKT, E. (1982)

Biliverdin IXa, Intermediate and End Product of Tetrapyrrole Biosynthesis
Z. Naturforsch. 37 c, 1057-1063

- KÖST, H-P., THOMA, H., WARM, E. and SCHMIDT, A. (1983)
Analysis of Protein and Poly-A⁺ RNA in Normal and Sulfurstarved *Synechococcus* 6301 // Electrophoresis '82 / Ed. Walter de Gruyter & Co., Berlin .New York
- KÖST, H-P., SENSER, M. and WANNER, G. (1984)
Effect of Nitrate and Sulphate Starvation on *Porphyridium cruentum* Cells
Z. Pflanzenphysiol. 113, 231-249
- KRÄMER, E. (1988)
Untersuchungen zur Steuerung der Nitrataassimilation bei *Chlorella fusca* auf der Stufe des Nitrits: Beeinflussung durch Kohlenstoff- und Schwefelversorgung
Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU/München
- LAEMMLI, U.K. (1970)
Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature 227, 680-685
- LARKUM, A.W.D. and WEYTRAUCH, S.K. (1977)
Photosynthetic Action Spectra and Light-Harvesting in *Griffithsia monilis* (Rhodophyta) // Photochemistry and Photobiology 25, 65-72
- LAU, R.H., MacKENZIE, M.M. and DOOLITTLE, W.F. (1977)
Phycocyanin Synthesis and Degradation in the Blue-green Bacterium *Anacystis nidulans* // J. Bacteriol. 132, 771-778
- LESK, A.M. and CHOTHIA, C. (1980)
How Different Amino Acid Sequences Determine Similar Protein Structures: The Structure and Evolutionary Dynamics of the Globins
J. Mol. Biol. 136, 225-270
- LOCKAU, W., MASSALSKY, B. and DIRMEIER, A. (1988)
Purification and Partial Characterization of a Calcium-Stimulated Protease from the Cyanobacterium, *Anabaena variabilis* // Eur. J. Biochem. 172, 433-438
- LUNDELL, D.J., WILLIAMS, R.C. and GLAZER, A.N. (1981a)
Molekular Architecture of a Light-Harvesting Antenna. In Vitro Assembly of the Rod Substructures of *Synechococcus* 6301 Phycobilisomes
J. Biol. Chem. 256, 3580-3592
- LUNDELL, D.J., YAMANAKA, G. and GLAZER, A.N. (1981b)
A Terminal Energy Acceptor of the Phycobilisome: The 75,000-Dalton Polypeptide of *Synechococcus* 6301 Phycobilisomes - A New Biliprotein
J. Cell Biology 91, 315-319
- MANODORI, A., ALHADEFF, M., GLAZER, A.N. and MELIS, A. (1984)
Photochemical Apparatus Organization in *Synechococcus* 6301 (*Anacystis nidulans*). Effect of Phycobilisome Mutation // Arch. Microbiol. 139, 117-123
- MAURER, H.R. (1968)
Disk Elektrophorese // Walter de Cruyter, Berlin
- MAYER, F. and CZYGAN, F-C (1969)
Änderungen der Ultrastrukturen in den Grünalgen *Ankistrodesmus braunii* und *Chlorella fusca* var. *rubescens* bei Stickstoffmangel // Planta 86, 175-185

- MILLER, L.S. and HOLT, S.C. (1977)
Effect of Carbon Dioxide on Pigment and Membrane Content in *Synechococcus lividus* // Arch. Microbiol. 115, 185-198
- MÖRSCHER, E., WEHRMEYER, W. and KOLLER, K-P. (1980)
Biliprotein Assembly in the Disc-Shaped Phycobilisomes of *Rhodella violacea*. Electron Microscopical and Biochemical Analysis of B-Phycoerythrin and B-Phycoerythrin-C-Phycocyanin Aggregates // Eur. J. Cell Biology 21, 319-327
- MOSS, R.A., LUKAS, T.J. and NAHAS, R.C. (1978)
Preparation and Kinetic Properties of Cysteine Surfactants
J. Am. Chem. Soc. 100:18, 5920-5927
- MOSS, R.A., CHIANG, Y-C.P. and HUI, Y. (1984)
Origins of Micellar Diastereoselectivity // J. Am. Chem. Soc. 106 7506-7513
- MUCKLE, G., OTTO, J. and RÜDIGER, W. (1978)
On the Linkages Between Chromophore and Protein in Biliproteins, VII⁽¹⁾. Amino Acid Sequence in the Chromophore Regions of C-Phycoerythrin from *Pseudanabaena* W 1173 and *Phormidium persicinum*
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 345-355
- MYERS, J. (1971)
Enhancement Studies in Photosynthesis¹ // Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 289-311
- NAGY, J.O., BISHOP, J.E., KLOTZ, A.V., GLAZER, A.N. and RAPOPORT, H. (1985)
Bilin Attachment Sites in the α , β and γ Subunits of R-Phycoerythrin
J. Biol. Chem. 260, 4864-4868
- NIEDERMEYER, I., BIEDLINGMAYER, S. and SCHMIDT, A. (1987)
Derepression of Arylsulfatase Activity by Sulfate Starvation in *Chlorella fusca* // Z. Naturforsch. 42c, 530-536
- NIERZWICKI, S.A., MARATEA, D., BALKWILL, D.L., HARDIE, L.P., MEHTA, V.B. and STEVENS, S.E. (1982)
Ultrastructure of the Cyanobacterium, *Mastigocladus laminosus*
Arch Microbiol. 133, 11-19
- NIERZWICKI-BAUER, S.A., BALKWILL, D.L. and STEVENS, S.E. (1984)
Morphology and Ultrastructure of the Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Growing Under Nitrogen-Fixing Conditions // Arch. Microbiol. 137, 97-103
- O'CARRA, P., MURPHY, R.F. and KILLILEA, S.D. (1980)
The Native Forms of the Phycobilin Chromophores of Algal Biliproteins
Biochem. J. 187, 303-309
- OHKI, K. and FUJITA, Y. (1978)
Photocontrol of Phycoerythrin Formation in the Blue-Green Alga *Tolypothrix tenuis* Growing in the Dark // Plant & Cell Physiol. 19, 7-15
- OWNBY, J.D., SHANNAHAN, M. and HOOD, E. (1979)
Protein Synthesis and Degradation in *Anabaena* During Nitrogen Starvation
J. General Microbiol. 110, 255-261
- PAPAGEORGIOU, G.C. and PACKER, L. (1983)
Photosynthetic Prokaryotes. Cell Differentiation and Function
Elsevier Biochemical Press / New York . Amsterdam . Oxford

- PEAT, A. and WHITTON, B.A. (1967)
Environmental Effects on the Structure of the Blue-green Alga,
Chlorogloea fritschii // Arch. für Mikrobiol. 57, 155-180
- PETERSON, R.B. and WOLK, C.P. (1978)
High Recovery of Nitrogenase Activity and of ^{55}Fe -Labeled Nitrogenase in Heterocysts Isolated from *Anabaena variabilis*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 6271-6275
- PRIESTLE, J.P., RHYNE, R.H., SALMON, J.B. and HACKERT, M.L. (1982)
Phycobiliproteins: Comparison of Solution and Single Crystal Fluorescence for C-Phycocyanin and B-Phycocerythrin // Photochem. Photobiol. 35, 827-834
- ROSINSKI, J., HAINFELD, J.F., RIGBI, M. and SIEGELMAN, H.W. (1981)
Phycobilisome Ultrastructure and Chromatic Adaptation in *Freymyella diplosiphon*
Ann. Bot. 47, 1-12
- RÜDIGER, W., O'CARRA, P. and O'HEOCHA, C. (1967)
Structure of Phycocerythrobilin and Phycocyanobilin // Nature 215, 1477-1478
- RÜDIGER, W. (1980)
Phytochrome, A Light Receptor of Plant Photomorphogenesis
in: Structure and Bonding, 40, 101-140 / Ed. Dunitz, J.D. & Co
Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- SCHEER, H. (1981)
Biliproteine // Angewandte Chemie 93, 230-250
- SCHEIBE, J. (1972)
Photoreversible Pigment: Occurrence in a Blue-Green Alga
Science 176, 1037-1039
- SCHIRMER, T., BODE, H. and HUBER, R. (1987)
Refined Three-Dimensional Structures of Two Cyanobacterial C-Phycocyanins at 2.1 and 2.5 Å Resolution // J. Mol. Biol. 196, 677-695
- SCHMETTERER, G. and PESCHEK, G.A. (1981)
Treatments Effecting Reversible Photobleaching and Thylakoid Degradation in the Blue-Green Alga *Anacystis nidulans*
Biochem. Physiol. Pflanzen 176, 90-100
- SCHMIDT, A. (1981)
The Role of Thioredoxins for Enzyme Regulation in Cyanobacteria
in: Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur. Ed. H. Bothe and A. Trebst, p. 326-333 / Springer Verlag Berlin . Heidelberg
- SCHMIDT, A., ERDLE, I. and KÖST, H-P.- (1982)
Changes of C-Phycocyanin in *Synechococcus* 6301 in Relation to Growth on Various Sulfur Compounds // Z. Naturforsch. 37c, 870-876
- SCHNEIDER, H.A.W. and BOGORAD, L. (1979)
Spectral Response Curves for the Formation of Phycobiliproteins, Chlorophyll and δ -Aminolevulinic Acid in *Cyanidium caldarium*
Z. Pflanzenphysiol. 94, 449-459

- SCHRAM, B.L. and KROES, H.H. (1971)
Structure of Phycocyanobilin // Eur. J. Biochem. 19, 581-594
- SCHREIBER, U., RIJGERSBERG, C.P. and AMESZ, J. (1979)
Temperature-Dependent Reversible Changes in Phycobilisome-Thylakoid Membrane Attachment in *Anacystis nidulans* // FEBS LETTERS 104, 327-331
- SCHROPP, E. (1986)
Untersuchungen zur Lösung und Knüpfung der Gallenfarbstoff-Apoprotein-Bindung am Beispiel von C-Phycocyanin aus *Spirulina maxima* und an Modellverbindungen
Dissertation an der Fakultät für Biologie der LMU/München
- SCHUSTER, A., KÖST, H-P., RÜDIGER, W. and EDER, J. (1983)
Investigations on the Apoprotein of Phycocyanin from *Cyanidium caldarium*
Arch. Microbiol. 135, 30-35
- SHERMAN, D.M. and SHERMAN, L.A. (1983)
Effect of Iron Deficiency and Iron Restoration on Ultrastructure of *Anacystis nidulans* // J. Bacteriol. 156, 393-401
- SIEBSEHNROBL, S., FISCHER, R. and SCHEER, H. (1987)
Chromophore Assignment in C-Phycocyanin from *Mastigocladus laminosus*
Z. Naturforsch. 42c, 258-262
- SIMON, R.D. (1973)
Measurement of the Cyanophycin Granule Polypeptide Contained in the Blue-Green Alga *Anabaena cylindrica* // J. Bacteriol. 114, 1213-1216
- STANIER, R.Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M. and COHEN-BAZIRE, G. (1971)
Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Alga (Order Chroococcales) // Bacteriological Rev. 35, 171-205
- STANIER, R.Y. and COHEN-BAZIRE, G. (1977)
Phototrophic Prokaryotes: The Cyanobacteria
Ann. Rev. Microbiol. 31, 225-274
- STEINMÜLLER, K., KALING, M. and ZETSCHKE, K. (1983)
In-Vitro Synthesis of Phycobiliproteins and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase by Non-Poly-Adenylated-RNA of *Cyanidium caldarium* and *Porphyridium aeruginum* // Planta 159, 308-313
- STEVENS, S.E. and VAN BAALEN, C. (1974)
Control of Nitrate Reductase in a Blue-Green Alga. The Effects of Inhibitors, Blue Light and Ammonia // Arch. Biochem. Biophys. 161, 146-152
- STEVENS, S.E., BALKWILL, D.L. and PAONE, D.A.M. (1981)
The Effects of Nitrogen Limitation on the Ultrastructure of the Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* // Arch. Microbiol. 130, 204-212
- STREIT, L. and FELLER, U. (1983)
Nitrogen-metabolizing Enzymes from Bean Leaves (*Phaseolus vulgaris* L.): Stability "in vitro" and Susceptibility to Proteolysis
Z. Pflanzenphysiol. 111, 19-27
- SWANK, R.T. and MUNKRES, K.D. (1971)
Molecular Weight Analysis of Oligopeptides by Electrophoresis in Polyacrylamide Gel with Sodium Dodecyl Sulfate // Analytical Biochem. 39, 462-477

TANDEAU DE MARSAC, N. (1977)

Occurrence and Nature of Chromatic Adaptation in Cyanobacteria
J.Bacteriol. 130, 82-91

TANDEAU DE MARSAC, N. and COHEN-BAZIRE, G. (1977)

Molecular Composition of Cyanobacterial Phycobilisomes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1635-1639

TISCHNER, R. and HUTTERMANN, A. (1978)

Light-Mediated Activation of Nitrate Reductase in Synchronous Chlorella
Plant Physiol. 62, 284-286

TISCHNER, R. and HÜTTERMANN, A. (1980)

Regulation of Glutamine Synthetase by Light and during Nitrogen Deficiency in
Synchronous Chlorella sorokiniana // Plant Physiol. 66, 805-808

TISCHNER, R. and SCHMIDT, A. (1984)

Light Mediated Regulation of Nitrate Assimilation in Synechococcus leopoliensis // Arch. Microbiol. 137, 151-154

TROXLER, R.F. (1972)

Synthesis of Bili Pigments in Plants. Formation of Carbon Monoxide and Phycocyanobilin in Wild-Type and Mutant Strains of the Alga, Cyanidium caldarium
Biochemistry 11, 4235-4242

TROXLER, R.F. and BROWN, A.S. (1979)

Amino Acid Sequence of the Phycocyanin α Subunit from the Alga, Cyanidium caldarium // Fed. Proc. 38, 325

TROXLER, R.F., GREENWALD, L.S. and ZILINSKAS, B.A. (1980)

Allophycocyanin from Nostoc sp. Phycobilisomes. Properties and Amino Acid Sequence at the NH₂ Terminus of the α and β Subunits of Allophycocyanins I, II, and III // J. Biol. Chem. 255, 9380-9387

WALSH, R.G., WINGFIELD, P., GLAZER, A.N. and DeLANGE, R.J. (1980)

Amino Acid Sequence of C-Phycocyanin, α -Subunit, from Synechococcus 6301 (Anacystis nidulans) // Fed. Proc. 39, 2060

WANG, R.T. and MYERS, J. (1976)

Simultaneous Measurement of Action Spectra for Photoreactions I and II of Photosynthesis // Photochem. and Photobiol. 23, 411-414

WANG, R.T., STEVENS, C.L.R. and MYERS, J. (1977)

Action Spectra for Photoreactions I and II of Photosynthesis in the Blue-Green Alga Anacystis nidulans // Photochemistry and Photobiology 25, 103-108

WANNER, G. and KÖST H-P. (1980)

Investigations on the Arrangement and Fine Structure of Porphyrin cruentum Phycobilisomes // Protoplasma 102, 97-109

WANNER, G., FORMANEK, H. and THEIMER, R.R. (1981)

The Ontogeny of Lipid Bodies (Spherosomes) in Plant Cells
Planta 151, 109-123

WANNER, G. and KÖST, H-P. (1984)

Membrane Storage of the Red Alga *Porphyridium cruentum* During Nitrate- and Sulphate Starvation // *Z. Pflanzenphysiol.* 113, 251-262

WANNER, G., HENKELMANN, G., SCHMIDT, A. and KÖST, H-P. (1986)

Nitrogen and Sulfur Starvation of the Cyanobacterium *Synechococcus* 6301. An Ultrastructural, Morphometrical and Biochemical Comparison
Z. Naturforsch. 41 c, 741-750

WEBER, K. and OSBORN, M. (1969)

The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis // *J. Biological Chemistry* 244, 4406-4412

WEBER, K., PRINGLE, J.R. and OSBORN, M. (1972)

Measurement of Molecular Weights by Electrophoresis on SDS-Acrylamid Gel
in: *Methods in Enzymology* XXVI, p. 3-27 / Ed. Hirs and Timasheff / New York

WEHRMEYER, W. and SCHNEIDER, H. (1975)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Reversiblen Veränderungen der Chloroplastenfeinstruktur von *Rhodella violacea* bei Stickstoffmangel
Biochem. Physiol. Pflanzen 168, 519-532

WHITTON, B.A. and CARR, N.G. (1982)

Cyanobacteria: Current Perspectives.
in: *The Biology of Cyanobacteria*. Ed. Carr and Whitton / Blackwell Scientific Publications, Oxford.London.Edinburgh.Boston / *Botanical Monographs*, 19, 1-8

WILLIAMS, V.P. and GLAZER, A.N. (1978)

Structural Studies on Phycobiliproteins. I. Bilin-Containing Peptides of C-Phycocyanin // *J. Biol. Chem.* 253, 202-211

WILLIAMS, R.C., GINGRICH, J.C. and GLAZER, A.N. (1980)

Cyanobacterial Phycobilisomes. Particles from *Synechocystis* 6701 and Two Pigment Mutants // *J. Cell Biology* 85, 558-566

WILLIAMSON, J.M. and MEISTER, A. (1981)

Stimulation of Hepatic Glutathione Formation by Administration of L-2-Oxothiazolidine-4-Carboxylate, a 5-Oxo-L-Proline Substrate
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 936-939

WOLK, C.P. and WOJCIUCH, E. (1971)

Photoreduction of Acetylene by Heterocysts // *Planta* 97, 126-134

WOOD, N.B. and HASELKORN, R. (1977)

Protein Degradation During Heterocyst Differentiation in the Blue-Green Alga *Anabaena* 7120 // *Fed. Proc.* 36, 886

WOOD, N.B. and HASELKORN, R. (1979)

Proteinase Activity During Heterocyst Differentiation in Nitrogen-Fixing Cyanobacteria // in: *Limited Proteolysis in Microorganisms* (Ed. Cohen and Holzer) p. 159-166 / US Department of Health, Education and Welfare Publication / (NIH) 79-1591. US Government Printing Office, Washington, D.C.

WOOD, N.B. and HASELKORN, R. (1980)

Control of Phycobiliprotein Proteolysis and Heterocyst Differentiation in *Anabaena* // *J. Bacteriol.* 141, 1375-1385

- YAMANAKA, G., GLAZER, A.N. and WILLIAMS, R.C. (1978)
Cyanobacterial Phycobilisomes. Characterization of the Phycobilisomes of *Synechococcus* sp. 6301 // J. Biological Chem. 253, 8303-8310
- YAMANAKA, G. and GLAZER, A.N. (1980)
Dynamic Aspects of Phycobilisome Structure. Phycobilisome Turnover During Nitrogen Starvation in *Synechococcus* sp. // Arch. Microbiol. 124, 39-47
- YAMANAKA, G. and GLAZER, A.N. (1981)
Dynamic Aspects of Phycobilisome Structure: Modulation of Phycocyanin Content of *Synechococcus* Phycobilisomes // Arch. Microbiol. 130, 23-30
- YU, M-H. and GLAZER, A.N. (1982)
Cyanobacterial Phycobilisomes. Role of the Linker Polypeptides in the Assembly of Phycocyanin // J. Biolog. Chem. 257, 3429-3433
- ZICKENDRAHT-WENDELSTADT, B., FRIEDRICH, J. and RÜDIGER, W. (1980)
Spectral Characterization of Monomeric C-Phycoerythrin from *Pseudoanabaena* W 1173 and Its α and β Subunits: Energy Transfer in Isolated Subunits and C-Phycoerythrin // Photochem. Photobiol. 31, 367-376
- ZILINSKAS, B.A., ZIMMERMAN, B.K. and GANTT, E. (1978)
Allophycocyanin Forms Isolated from *Nostoc* sp. Phycobilisomes
Photochem. Photobiol. 27, 587-595

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. A. Schmidt angefertigt und zum Teil durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Herrn Prof. Dr. A. Schmidt danke ich herzlich für die freundliche Betreuung der Arbeit, den hilfreichen Ratschlägen und für die anregenden und kritischen Diskussionen.

Ganz besonders danke ich meinem Mann Günther Hiller für seine geduldige Mithilfe bei der deutschen Abfassung der vorliegenden Arbeit.

Mein Dank gilt auch Dr. habil. H.-P. Köst für die Einführung in die Thematik dieser Arbeit, seine Hilfsbereitschaft und seine konstruktiven Ratschläge.

Herrn Dr. Lottspeich und Frau B. Ammemann (Max-Planck-Institut, Genzentrum, Martinsried) danke ich für die Sequenzierung der Schnittstelle des Enzyms am Phycocyanin.

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Scheer bedanke ich mich für die freundlichen Diskussionen bezüglich Phycobiliproteinen und für die Benutzung der Laborgeräte. Insbesondere danke ich Herrn Dr. W. John für die Einführung in die Technik der Elektrophorese.

Auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rau möchte ich für die Benutzung des Ultraschallgerätes danken.

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern des Arbeitskreises, die zum angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich hier Frau K. Felkl und Frau E. Krämer für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung danken.

Lebenslauf

- 1.7.49 Geburt in Villameca (León) Spanien
- 1955-1961 Grundschule in Villameca
- 1961-1963 Schulinternat in Libourne (Frankreich)
- 1963-1967 Oberschule in Astorga (Spanien)
- 1967-1973 Abendgymnasium in Aachen (BRD)
- 1973-1974 Studium des C.O.U. (Vorbereitung auf das Universitätsstudium) an der Oberschule "Cardenal Cisneros" in Madrid (Spanien)
- 1974-1979 Studium der Biologie an der "Universidad Complutense de Madrid". Am 7.12.1979 wurde mir der Titel eines Diplom-Biologen verliehen
- 1980-1982 Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, der Tierärztlichen Fakultät der LMU München bei Prof. Dr. G. Terplan. Hier habe ich u.a. die Forschungsarbeit zum Thema "Vergleichende Untersuchungen zur Thermoresistenz von Salmonella Serovaren aus Trockenprodukten und unbehandelten Materialien" angefertigt, welche ich als Diplomarbeit bei Prof. Dr. J.A. Arroyo Merino in Madrid abgelegt habe
- 1983 Beginn der Dissertation bei Prof. Dr. A. Schmidt

Am 5.5.1985 wurde meine Tochter Caroline geboren

